



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA NUMERO	102006901472145
Data Deposito	30/11/2006
Data Pubblicazione	30/05/2008

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

PEPTIDI METASTASI-SPECIFICI E LORO APPLICAZIONI DIAGNOSTICHE E TERAPEUTICHE.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:
"Peptidi metastasi-specifici e loro applicazioni
diagnostiche e terapeutiche"

di: Università degli Studi di Torino, nazionalità
italiana, via Verdi 8, 10124 Torino

Inventori designati: Federico BUSSOLINO, Serena
MARCHIÒ

Depositata il: 30 novembre 2006

TESTO DELLA DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione concerne peptidi che presentano elevata specificità verso cellule di metastasi tumorali, in particolare cellule di metastasi epatiche, e loro applicazioni in campo diagnostico e terapeutico.

SFONDO TECNICO DELL'INVENZIONE

Il tumore e la metastatizzazione

La tumorigenesi è un processo a più stadi, attraverso i quali alcune cellule evolvono progressivamente verso la malignità. L'attuale bagaglio di conoscenze nell'ambito delle neoplasie ha evidenziato come il cancro sia una malattia indotta da cambiamenti dinamici del genoma. Attraverso queste variazioni, le cellule tumorali acquisiscono indipendenza rispetto ai vari

meccanismi che regolano il funzionamento fisiologico dell'organismo. Come conseguenza, esse diventano capaci (1) di riprodursi indefinitamente, (2) di indurre il reclutamento di cellule endoteliali per la formazione di nuovi vasi sanguigni e (3) di colonizzare organi diversi da quello di origine.

L'abilità proliferativa delle cellule tumorali è legata fundamentalmente a due meccanismi. In primo luogo, mentre le cellule normali necessitano di fattori mitogenici per passare da uno stato quiescente ad uno attivato proliferante, in una cellula tumorale mutazioni e/o sovra-espressione di recettori per fattori di crescita possono indurre la cascata di proliferazione indipendentemente dalla presenza del ligando. Inoltre, in molti casi, le cellule tumorali acquisiscono la capacità di sintetizzare fattori solubili cui sono esse stesse sensibili. Si instaura cioè una stimolazione autocrina che favorisce ulteriormente l'espansione tumorale. L'altro fenomeno di deregolazione della proliferazione nei tumori è la resistenza all'apoptosi (morte cellulare programmata). Questo meccanismo, fondamentale nella crescita e nel rimodellamento degli organi durante lo sviluppo fisiologico, è indotto anche nell'eventualità di danni irreversibili al genoma, proprio per evitare

l'espandersi di popolazioni cellulari aberranti. Alcune cellule possono però sfuggire a tale forma di protezione e diventarne indipendenti, favorendo così la propagazione delle mutazioni e la conseguente progressione neoplastica.

La massa tumorale ai primordi è costituita da un esiguo numero di cellule, e non potrebbe svilupparsi al di sopra di 2 mm di diametro se non fosse sostenuta da un adeguato supporto di nutrienti e di ossigeno. È questa la fase in cui l'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi capillari a partire da vasi sanguigni pre-esistenti, è fortemente stimolata dalle cellule tumorali stesse. Lo sbilanciamento dei segnali positivi e negativi della regolazione dell'angiogenesi porta alla neoformazione di una rete vascolare, che permea e rifornisce la massa neoplastica in attiva proliferazione. I vasi sanguigni del tumore, oltre a provvedere all'apporto nutritizio, assolvono la funzione di veicolare le cellule maligne verso altri distretti dell'organismo.

La progressione del tumore evolve verso uno stadio di irreversibilità, la cui caratteristica culminante è la metastatizzazione. In questo processo, cellule pioniere sfuggono alla massa

tumorale primaria. Una volta entrate nei capillari che afferiscono al tumore, raggiungono il sistema circolatorio, che le trasporta in regioni distanti dal sito di derivazione, dove daranno vita ad un tumore secondario. Lo sviluppo delle metastasi rappresenta un evento biologico complesso, legato all'interazione tra fattori propri dell'organismo (condizioni generali, integrità della risposta immunitaria) e caratteristiche specifiche delle cellule tumorali (sede, dimensioni e caratteri istologici). Dal microscopico focolaio iniziale la diffusione delle cellule tumorali avviene dapprima localmente mediante uno sviluppo centrifugo. Liberando proteasi in grado di degradare le connessioni intracellulari e la matrice extracellulare, le cellule tumorali si fanno strada attraverso strutture anatomiche e tessuti che offrono scarsa resistenza (il tessuto adiposo, le guaine dei nervi, il midollo osseo). Un primo ostacolo alla diffusione metastatica è offerto dalla presenza di strutture relativamente impenetrabili, quali le capsule degli organi, la cartilagine o il periostio, le meningi. Data la difficoltà di superare queste barriere, la metastatizzazione in siti distanti deve seguire una serie di tappe, che possono essere così riassunte: (1) l'ingresso nella

rete capillare del tumore, (2) il trasporto attraverso il circolo sanguigno, (3) il riconoscimento specifico dell'endotelio di destinazione, (4) la fuoriuscita dal capillare mediante un processo definito "extravasazione" e (5) lo sviluppo della metastasi, supportato da attiva angiogenesi.

Il successo della disseminazione dipende dalle caratteristiche anatomiche e dai fattori emodinamici dell'organo ospite, e dalle interazioni che le cellule tumorali instaurano con l'endotelio che ricopre i vasi sanguigni. Le vie di diffusione più comuni sono i vasi (linfatici e sanguigni) e le cavità celomatiche. I vasi linfatici sono penetrati abbastanza facilmente, per l'assenza di una lamina basale. Per questo motivo, le cellule tumorali possono agevolmente transitare all'interno dei linfonodi, prima di essere immesse nel sistema venoso attraverso le connessioni linfatico-venose. Il trasporto all'interno dei vasi può interessare sia il sistema arterioso che quello venoso, sebbene l'invasione venosa sia più comune, dal momento che la circolazione venosa raccoglie il flusso in uscita dagli organi. Esempi tipici sono la vena sistemica per il polmone o la vena porta per il fegato. La disseminazione trans-celomatica riguarda invece la

cavità pleurica del torace, e gli spazi peritoneali dell'addome e delle pelvi. Il sito più comunemente coinvolto è il peritoneo, dove, a seguito di versamento di liquidi per ostruzione delle vene epatiche, le cellule tumorali sono raccolte nel fluido ascitico. I tumori allo stomaco, colon, pancreas e ovaio comunemente adottano questo sistema. Seguendo questa via, il fegato diventa una delle mete preferenziali.

Le cellule tumorali metastatiche esprimono determinanti molecolari specifici, che contribuiscono in vari modi all'instaurarsi della metastasi stessa. La distribuzione dei focolai metastatici non avviene casualmente, ma ogni tumore ha sedi preferenziali, fenomeno noto come "organo-tropismo". Il fegato rappresenta un organo bersaglio per i tumori del colon-retto; le ossa per quelli della prostata e della mammella; i polmoni per i tumori del testicolo, dell'osso e della mammella. I polmoni ed il fegato, data la funzione di filtro e lo sviluppo notevole di capillari, sono suscettibili di ricevere metastasi pressoché da ogni organo e di inviare altresì colonie tumorali, prevalentemente verso il cervello e le ossa.

Il fegato è un sito comune per le lesioni

metastatiche. Il motivo deve essere ricercato nell'organizzazione funzionale e strutturale del distretto epatico. La vena porta, che drena il sangue ai visceri addominali, rappresenta il condotto attraverso il quale le cellule provenienti dai tumori primari sono veicolate al fegato. L'adesione delle cellule tumorali circolanti all'endotelio del fegato è uno stadio critico per l'inizio della metastatizzazione. Le metastasi epatiche si sviluppano in seguito all'invasione del parenchima epatico da parte di questi trombi cellulari.

L'elevato volume del flusso sanguigno epatico (circa il 25% di quello cardiaco), e la particolare anatomia microscopica dei sinusoidi sono i fattori che favoriscono la disseminazione a livello epatico. I tumori di origine possono essere localizzati al tratto gastro-intestinale, ovvero colon, retto, stomaco, pancreas, tratto biliare e intestino tenue. A questi si aggiungono anche quelli alla mammella ed al polmone.

Tumore al colon-retto

Esistono diversi tipi di classificazione che, in generale, suddividono l'evoluzione progressiva della malattia in stadi caratterizzati dal grado di

invasione corporea del tumore. Le classificazioni di Dukes e MAC (Modified Astler-Coller), proposte all'inizio degli studi clinici, sono attualmente quelle meno usate. Viene in genere preferita la nomenclatura TNM (Tumore Nodi Metastasi), che prevede 4 stadi successivi:

- stadio I: tumore limitato alla mucosa e alla sottomucosa,
- stadio II: estensione agli strati più profondi della parete intestinale,
- stadio III: invasione della sottosierosa e dei linfonodi,
- stadio IV: metastasi.

Gli iter terapeutici ad oggi più praticati sono la chirurgia, la chemioterapia e la radioterapia. Il tipo di strategia clinica è scelta in funzione dello stadio di progressione in cui si trova la patologia. In linea generale, si adottano i seguenti protocolli:

- stadio I: intervento chirurgico (colectomia),
- stadio II: l'intervento può essere associato ad un trattamento chemioterapico,
- stadio III: l'intervento è in ogni caso associato ad un trattamento chemioterapico,

- stadio IV: trattamento palliativo con intervento chirurgico e/o chemioterapia.

Il fegato è la sede di colonizzazione più ricorrente del tumore coloretale primario. Attualmente l'unico trattamento con un potenziale curativo è l'asportazione chirurgica delle metastasi. Tuttavia, nonostante i mezzi sempre più efficaci a disposizione della chirurgia epatica, la maggior parte dei pazienti affetti da tumore coloretale con metastasi epatiche non rientra nei canoni di operabilità, a causa dell'estensione della massa tumorale.

**Un diverso approccio alla terapia del cancro:
attaccare i vasi sanguigni del tumore**

Gli agenti chemioterapici attualmente in uso sono tra i farmaci con la finestra terapeutica più stretta in tutto il campo medico. Di conseguenza, la dose di agenti antitumorali che può essere somministrata è limitata dai loro effetti tossici sui tessuti normali. Questa difficoltà può essere superata indirizzando i farmaci citotossici direttamente nel tumore. Anche se il raggiungimento di questo obiettivo è da lungo tempo un proposito della biologia del cancro e della medicina oncologica, al momento si conoscono solo pochi casi

in cui è possibile la somministrazione mirata di un farmaco. Ad esempio, l'utilizzo di anticorpi monoclonali contro antigeni tumorali ha avuto un successo limitato, dal momento che solo alcuni antigeni tumorali sono conosciuti e gli anticorpi generalmente penetrano in modo inefficiente nei tessuti. Inoltre, siccome le cellule tumorali sono geneticamente instabili e si accumulano rapidamente mutazioni vantaggiose per la crescita, trattamenti mirati alle cellule del tumore sono generalmente seguiti dalla selezione clonale di cellule resistenti.

L'indirizzamento della terapia alla rete vascolare dei tumori permette il superamento di alcuni dei problemi legati alla terapia tradizionale. Le cellule endoteliali nel sistema vascolare tumorale esprimono molecole caratteristiche dei vasi angiogenici. Questi marcatori di angiogenesi possono essere utilizzati come bersagli per una terapia mirata. L'indirizzamento vascolare offre vari vantaggi. Innanzitutto, il rivestimento endoteliale dei vasi è facilmente accessibile. Al contrario, un farmaco indirizzato al tumore deve diffondere su ampie distanze, penetrare attraverso cellule neoplastiche a stretto contatto e attraverso uno stroma molto

denso, e contrastare una pressione interstiziale elevata. In secondo luogo, poiché le cellule tumorali dipendono dall'apporto di sangue per la loro sopravvivenza, una terapia antitumorale diretta contro i vasi non deve necessariamente portare alla distruzione di tutte le cellule endoteliali. Infatti, la terapia mirata all'endotelio possiede un meccanismo di amplificazione intrinseco. Infine, dato che le cellule endoteliali sono diploidi e non trasformate, è improbabile che perdano un recettore di superficie cellulare o acquisiscano la resistenza ad un farmaco mediante mutazioni ed evoluzione clonale. Alcuni marcatori endoteliali sono stati recentemente identificati. Tra queste molecole vi sono alcune integrine, in particolare $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ e recettori a tirosina cinasi specifici per l'endotelio con i rispettivi ligandi (recettori di VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor, e i vari VEGF, Tie1, Tie2 e le angiopoietine)^{1,2}.

Peptidi che si indirizzano ad un modello di tumore umano nel topo: individuazione di marcatori dell'endotelio tumorale

Mediante studi di phage display condotti in vivo su diversi modelli animali sono stati individuati peptidi capaci di indirizzarsi

selettivamente alla vascolarizzazione tumorale⁵. Queste sequenze si sono dimostrate un valido strumento per caratterizzare l'endotelio tumorale ed i suoi determinanti molecolari specifici, oltre che per progettare applicazioni biotecnologiche alla terapia antitumorale.

In questo modo sono state identificate sequenze peptidiche ricorrenti, quali ad esempio RGD (Arginina-Glicina-Acido aspartico)³ e NGR (Asparagina-Glicina-Arginina)⁴⁻⁷. Il motivo RGD è contenuto nella struttura peptidica di varie proteine della matrice extracellulare, e ne costituisce il sito di interazione con le integrine. Il fago che espone la sequenza CDCRGDCFC, denominato RGD-4C, è in grado di indirizzarsi specificamente al tumore mammario, e di legare in modo selettivo le integrine $\alpha\beta3$ e $\alpha\beta5$ ⁸. Esperimenti in vitro hanno dimostrato che peptidi contenenti RGD inibiscono l'adesione cellula-cellula inducendo apoptosi. Si è pensato, pertanto, che il peptide RGD, senza ulteriori modificazioni, potesse agire come farmaco antiangiogenico, causando la morte dell'endotelio per distacco delle interazioni cellula-matrice. Anche il tripeptide NGR lega le integrine, sebbene con minore affinità rispetto a RGD. Il recettore specifico per la sequenza NGR è stato

successivamente riconosciuto in una proteina di membrana, l'aminopeptidasi N (APN)⁹⁻¹⁰, sovraespressa nelle strutture vascolari in attiva angiogenesi e non rivelabile nell'endotelio quiescente. E' stato dimostrato che anticorpi specifici per APN sono in grado di inibire la neovascolarizzazione retinale indotta da ipossia, nel topo. Allo stesso modo, topi trattati con anticorpi anti-APN presentano tumori alla mammella fortemente regrediti rispetto al gruppo di controllo.

In un'altra serie di studi sono stati trovati peptidi in grado di legare selettivamente il proteoglicano NG2¹¹, omologo murino di HMP (Human Melanoma Proteoglycan), anche conosciuto come High Molecular Weight Melanoma-Associated Antigen. Questo proteoglicano è espresso principalmente dalle cellule progenitrici della glia, del muscolo scheletrico e del tessuto cartilagineo. In seguito a differenziamento, l'espressione di NG2 in superficie è persa. Nell'adulto la sua presenza è limitata a vasi in attiva angiogenesi in alcuni tipi di tumori, tra cui glioblastomi, condrosarcomi, melanomi, ed alcune leucemie. In un topo nudo portatore di melanoma maligno, un anticorpo contro NG2 coniugato con la doxorubicina sopprime la crescita tumorale.

Peptidi come farmaci antitumorali

I fenomeni di rimodellamento della matrice extracellulare sono comuni all'attivazione endoteliale e all'invasione neoplastica, e necessitano dell'azione di particolari enzimi detti Metallo-Proteasi di matrice (MMP). Queste proteasi, sovraesprese nel tumore, sono quasi assenti nei tessuti sani, se non al momento della migrazione cellulare e del rimodellamento tissutale durante la morfogenesi. Mediante phage display sono stati isolati inibitori sintetici di due proteasi di questa famiglia, MMP-2 (Gelatinasi A; di 72 Kd) e MMP-9 (Gelatinasi B; di 92 Kd), che sono quelle più strettamente implicate nell'angiogenesi e nel potenziale metastatico. Da questo studio, si è visto che i cloni più rappresentati esprimono la sequenza LRSGRG derivata da una libreria CX₆C. Un'altra famiglia peptidica, identificata da una collezione CX₉, è quella con il motivo HWGF. I peptidi solubili contenenti il motivo HWGF dimostrano attività inibitoria in vitro nei confronti di MMP-9. Questi peptidi inibiscono la migrazione di linee cellulari tumorali e di cellule endoteliali derivate da cordone ombelicale umano. In vivo, sono efficaci nell'inibire l'istaurarsi del tumore, nel curare un tumore già stabilito e nel prevenire la comparsa di

metastasi¹².

Impiego dei peptidi in terapie antitumorali biotecnologicamente innovative

Come descritto nei paragrafi precedenti, peptidi associati specificamente a marcatori dell'endotelio tumorale o delle cellule tumorali sono stati impiegati con successo in protocolli terapeutici nel topo. Un secondo approccio è stato investigato coniugando i peptidi RGD-4C e CNGRC all'agente chemioterapico doxorubicina, ed utilizzando questo composto per il trattamento del tumore alla mammella nel topo. Gli animali sottoposti a questa terapia sono sopravvissuti fino a sei mesi, dimostrando che questo composto è in grado di inibire lo sviluppo del tumore primario e delle metastasi con maggiore efficacia e minore tossicità rispetto alla somministrazione sistemica.

In un terzo tipo di applicazione sono stati costruiti peptidi chimerici, che possiedono cioè due domini funzionali. Il primo di questi domini è in grado di legarsi in modo selettivo alla cellula bersaglio e di essere internalizzato; l'altro è proapoptotico, non tossico nei fluidi corporei ma solo nell'ambiente intracellulare. Esistono più di 100 peptidi antibiotici che esplicano la loro azione

provocando la rottura delle membrane mitocondriali ed inducendo apoptosi. Tra questi è stata scelta una sequenza di 14 aa, KLAKLAKKLAKLAK, che ha dimostrato di avere un forte potenziale antibiotico nella forma di D-enantiomero¹³. A questo peptide sono stati accoppiati i peptidi RGD-4C e CNGRC. E' stato osservato che questi composti causano alterazioni a carico dei mitocondri e provocano la comparsa di variazioni morfologiche classiche di uno stato apoptotico, quali condensazione e frammentazione delle strutture nucleari. Questi risultati trovano conferma in vivo: i topi cui è somministrato l'agente antitumorale presentano tumori di dimensioni ridotte e sopravvivono per vari mesi.

DESCRIZIONE GENERALE DELL'INVENZIONE

La comparsa di metastasi è un fattore prognostico sfavorevole nell'evoluzione del tumore. E' quindi fondamentale sviluppare metodi che permettano di rivelare ed aggredire precocemente anche metastasi di dimensioni sub-cliniche. In molti casi, le metodiche isto-patologiche comunemente utilizzate per la diagnosi permettono di seguire la localizzazione delle metastasi quando non sono più aggredibili terapeuticamente. Anche dal punto di vista della terapia, gli attuali approcci risentono di limiti legati soprattutto alla tossicità

aspecifica dei farmaci chemioterapici.

Le cellule metastatiche presentano caratteristiche peculiari, sia rispetto al tumore di origine che al tessuto in cui si localizzano. Allo stesso modo, le cellule dei vasi sanguigni (cellule endoteliali) tumorali si distinguono da quelle normali quiescenti. In particolare, modificazioni significative riguardano la superficie cellulare, sulla quale sono espresse o modificate molecole per favorire l'adattamento al nuovo ambiente. I metodi di studio classici si sono dimostrati inadeguati nell'affrontare in toto il problema della molteplicità di tali modificazioni.

La presente invenzione si prefigge lo scopo di fornire una soluzione in grado di superare gli inconvenienti della tecnica nota delineati in precedenza.

Secondo la presente invenzione, tale scopo è raggiunto grazie ai peptidi aventi le sequenze richiamate in modo specifico nelle rivendicazioni che seguono. L'invenzione riguarda anche l'impiego in campo terapeutico e diagnostico di tali peptidi.

Le rivendicazioni formano parte integrante dell'insegnamento tecnico qui fornito in relazione all'invenzione.

La presente invenzione concerne peptidi, che

riconoscono specificamente cellule metastatiche epatiche. L'invenzione concerne anche l'utilizzo di coniugati e composizioni farmaceutiche di questi peptidi, quando essi siano legati ad un agente diagnostico (ad esempio un tracciante) o ad un agente terapeutico (ad esempio un chemioterapico, un isotopo radioattivo o una tossina), rispettivamente, per la localizzazione sia in vitro sia in vivo di cellule metastatiche epatiche e per la terapia in un soggetto affetto da tumore.

La presente invenzione è in grado di fornire peptidi con elevata selettività di legame verso cellule metastatiche epatiche umane e conseguentemente di permettere una efficiente localizzazione sia in vitro sia in vivo di tali cellule, così da poter essere vantaggiosamente impiegati sia per la diagnosi, sia per la terapia di tumori che metastatizzano al fegato, in particolare, tumori primari del colon-retto.

Oltre all'aspetto terapeutico, peptidi che riconoscano selettivamente cellule metastatiche epatiche rappresentano un mezzo utile per la diagnosi proprio delle metastasi. Le piccole dimensioni di questi peptidi sono assai vantaggiose per questo tipo di applicazioni. Ad esempio, coniugati dei peptidi secondo la presente invenzione

con radionuclidi o sostanze fluorescenti possono essere utilizzati in pazienti con tumori occulti o con referti radiologici non-specifici. Inoltre, possono essere utilizzati per scopie in vivo, quali ad esempio risonanza magnetica o TAC, dopo coniugazione con appropriate molecole per la loro visualizzazione. Per scopia, in questo ambito, si intende una qualsiasi tecnica di visualizzazione di una zona del corpo di un soggetto opportunamente trattata.

Dettagli sulle tecniche di formulazione e somministrazione di coniugati o composizioni farmaceutiche sono noti nell'arte e non necessitano in questa sede di una descrizione dettagliata, non essendo altresì indispensabili alla comprensione dell'invenzione.

Gli inventori della presente invenzione hanno utilizzato una metodica di carattere proteomico (phage display) per caratterizzare i determinanti molecolari espressi sulla superficie di cellule derivate da metastasi epatiche umane secondarie a carcinoma del colon-retto. Tale tecnica ha permesso di isolare peptidi in grado di interagire con molecole di membrana presenti esclusivamente su queste cellule. L'identificazione di peptidi che riconoscono determinati molecolari non presenti nei

tessuti normali o nel tumore primitivo permette l'impiego di tali peptidi sia a scopi diagnostici che terapeutici. Dal punto di vista diagnostico questi peptidi, opportunamente marcati, sono utilizzabili per individuare le metastasi epatiche anche in stadi pre-clinici. Dal punto di vista terapeutico è possibile coniugarli con farmaci chemioterapici in modo da mettere a punto protocolli di chemioterapia mirata.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE ANNESSE

- La figura 1 rappresenta le sequenze dei peptidi leganti cellule metastatiche epatiche secondo la presente invenzione, in particolare le SEQ ID NO. 1-7 rappresentano i peptidi che sono stati studiati in modo più approfondito, selezionati negli esperimenti su pazienti 16, 17 e 18; le SEQ ID NO. 8-18 rappresentano i peptidi selezionati nel III ciclo di selezione su campione da paziente 2; le SEQ ID NO. 20-39 rappresentano i peptidi selezionati nel II ciclo di selezione su campione da paziente 6; le SEQ ID NO. 40-64 rappresentano i peptidi selezionati nel III ciclo di selezione su campione da paziente 7; le SEQ ID NO. 65-78 rappresentano i peptidi selezionati nel II ciclo di selezione su campione da paziente 8;

le SEQ ID NO. 79-95 rappresentano i peptidi selezionati nel II ciclo di selezione su campione da paziente 16; le SEQ ID NO. 96-107 rappresentano i peptidi selezionati nel III ciclo di selezione su campione da paziente 16; le SEQ ID NO. 108-109 rappresentano i peptidi selezionati nel III ciclo di selezione su campione da paziente 17; le SEQ ID NO. 110-118 rappresentano i peptidi selezionati nel III ciclo di selezione su campione da paziente 18; le SEQ ID NO. 119-122 rappresentano i peptidi selezionati nel IV ciclo di selezione su campione da paziente 18; le SEQ ID NO. 123-140 rappresentano i peptidi selezionati nel IV ciclo di selezione su campione da paziente 19; le SEQ ID NO. 141-152 rappresentano i peptidi selezionati nel IV ciclo di selezione su campione da paziente 21; le SEQ ID NO. 153-170 rappresentano i peptidi selezionati nel II ciclo di selezione su campione da paziente 23; le SEQ ID NO. 171-186 rappresentano i peptidi selezionati nel IV ciclo di selezione su campione da paziente 5; le SEQ ID NO. 187-201 rappresentano i peptidi selezionati nel II ciclo di selezione su campione da paziente 8;

- Le figure 2-7 rappresentano esempi di

decorazione di tessuti con i fagi #7 e #8; in particolare: la figura 2 rappresenta le prove effettuate su un campione di fegato sano (risultato negativo); la figura 3 rappresenta le prove effettuate su un campione di tumore primario del colon (risultato negativo); la figura 4 rappresenta le prove effettuate su un campione di tumore primario della mammella (risultato negativo); la figura 5 rappresenta le prove effettuate su un campione di tumore primario dell'ovaio (unico risultato positivo tra tutti i campioni di questo tipo testati); la figura 6 rappresenta le prove effettuate su un campione di metastasi omentale secondaria a tumore dell'ovaio (unico risultato positivo tra tutti i campioni di questo tipo testati); la figura 7 rappresenta le prove effettuate su un campione di metastasi epatica secondaria a tumore del colon (risultato positivo);

- La figura 8 rappresenta la sequenza nucleotidica del primer utilizzato per il sequenziamento dell'insero oligonucleotidico all'interno del DNA del fago;
- La figura 9 rappresenta una fotografia del gel di poliacrilammide sul quale sono state separate le proteine legate al peptide GIYRLRS

fuso con GST.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

L'invenzione sarà ora descritta in modo dettagliato, a puro titolo di esempio non limitativo.

I peptidi identificati nell'ambito della presente invenzione sono utilizzabili quali strumenti molecolari sia in campo diagnostico sia in campo terapeutico. È risaputo che le attuali metodiche terapeutiche impiegate nell'oncologia clinica sono caratterizzate da scarsa selettività. Un agente chemioterapico circolante nel sistema sanguigno colpisce, oltre alle masse tumorali, tutte le popolazioni cellulari dell'organismo in attiva proliferazione. Al contrario, un peptide che sia riconosciuto in modo selettivo da recettori di superficie caratteristici di un determinato tipo cellulare sarà in grado di indirizzare un farmaco chemioterapico preferenzialmente a quel tipo di cellule. I peptidi secondo la presente invenzione possono, quindi, essere vantaggiosamente impiegati come veicoli di farmaci alle metastasi epatiche.

Inoltre, peptidi marcati con una molecola rivelatrice possono essere impiegati in campo diagnostico. Attualmente sono impiegate tecniche di

rivelazione che non permettono di risolvere una formazione metastatica molto precoce dal tessuto sano circostante. La tecnologia che sfrutta l'impiego di peptidi marcati per la rivelazione di cellule tumorali si basa invece sulle differenze molecolari che distinguono queste cellule dalle altre. I peptidi secondo la presente invenzione sono in grado di rivelare anche singole cellule di metastasi epatica umana.

I dati raccolti sui peptidi secondo la presente invenzione possono essere così riassunti:

- 1) i peptidi selezionati nell'ambito della presente domanda condividono un'elevata omologia di sequenza tra loro, indicando la specificità della selezione effettuata;
- 2) i peptidi secondo la presente invenzione possiedono elevata omologia con motivi appartenenti a proteine specifiche del distretto epatico e/o correlate con patologie neoplastiche;
- 3) dalle prove di legame emerge che i peptidi hanno un'elevata specificità per molecole di superficie esposte su cellule di metastasi epatiche umane sia primarie che in coltura, mentre non mostrano affinità per cellule

- primarie di fegato sano o per linee cellulari di tumori primari o di altri tipi di metastasi;
- 4) i peptidi secondo la presente invenzione legano in modo universale le cellule di metastasi epatiche indipendentemente da stadio metastatico, quadro clinico o altre caratteristiche proprie di ogni paziente, costituendosi come validi candidati diagnostico-prognostici e terapeutici.

A. DEFINIZIONI

1. Sistema di indirizzamento

La definizione "sistema di indirizzamento" comprende vari tipi di reagenti che possono essere utilizzati per aumentare la localizzazione o il legame di una sostanza in un particolare distretto corporeo in un animale, compresi organi, tessuti, particolari tipi cellulari o tumori. Sistemi di indirizzamento possono includere peptidi, peptidomimetici, polipeptidi, anticorpi, molecole simili ad anticorpi, acidi nucleici, aptameri e frammenti dei medesimi. In certe forme di applicazione, un sistema di indirizzamento aumenterà la localizzazione di una sostanza a cellule di metastasi epatiche secondarie a colon carcinoma, mediante legame a proteine della superficie di dette cellule, cioè mediante legame a proteine

transmembrana o associate alla superficie o secrete o associate alla matrice extracellulare. Il legame selettivo di un sistema di indirizzamento, quale ad esempio un peptide o un anticorpo, così come varianti o frammenti dei medesimi, è definito quando il sistema di indirizzamento lega il bersaglio (ad esempio le cellule della metastasi epatica secondaria a colon carcinoma) e non lega significativamente cellule non correlate.

2. Peptide di indirizzamento

Un "peptide di indirizzamento" è un peptide comprendente una sequenza contigua di aminoacidi, che è caratterizzata dalla localizzazione selettiva in un organo, tessuto o tipo cellulare, dovuta a legame specifico ad una proteina o molecola extracellulare che è selettivamente espressa o prodotta in uno specifico tessuto o tipo cellulare.

3. Recettore

Un "recettore" per un peptide di indirizzamento include, ma non è limitato a, qualunque molecola o complesso molecolare che si lega ad un peptide di indirizzamento. Esempi non limitanti di recettori includono peptidi, proteine, glico-proteine, lipo-proteine, epitopi, lipidi, carboidrati, strutture multi-molecolari e conformazioni specifiche di una o più molecole. Più specificamente, un "recettore" è

una molecola che occorre in natura o un complesso molecolare che è presente sulla superficie luminale di cellule che formano i vasi sanguigni all'interno di un organo, tessuto o tipo cellulare bersaglio.

4. Residuo aminoacidico

Un "residuo aminoacidico" si riferisce a qualunque aminoacido naturale, qualunque derivato aminoacidico o qualunque mimetico di aminoacido che sia conosciuto nella tecnica. I residui di una proteina sono generalmente sequenziali, senza non-aminoacidi ad interrompere la sequenza di residui aminoacidici. In particolari applicazioni, la sequenza aminoacidica può comprendere uno o più non-aminoacidi. In particolari forme di attuazione, la sequenza dei residui di un peptide secondo la presente invenzione può essere interrotta da uno o più non-aminoacidi. Residui aminoacidici modificati o inusuali comprendono, ma non sono limitati a: Acido 2-aminoadipico (Aad); N-etilasparagina (EtAsn); acido 3-aminoadipico (Baad); idrossilisina (Hyl); beta-alanina (Bala); acido beta-aminopropionico; alloidrossilisina (AHyl); acido 2-aminobutirrico (Abu); 3-idrossiprolina (3Hyp); acido 4-aminobutirrico (4Abu); acido piperidinico; 4-idrossiprolina (4Hyp); acido 6-aminocaproico (Acp); Isodesmosina (Ide); acido 2-aminoeptanoico (Ahe);

allo-isoleucina (AIle); acido 2-aminoisobutirrico (Aib); N-metilglicina (MeGly); sarcosina; acido 3-aminoisobutirrico (Baib); N-metilisoleucina (MeIle); acido 2-aminopimelico (Apm); 6-N-metillisina (MeLys); acido 2,4-diaminobutirrico (Dbu); N-metilvalina (MeVal); desmosina; norvalina; acido 2,2'-diaminopimelico (Dpm); norleucina; acido 2,3-diaminoproprionico (Dpr); ornitina; N-etilglicina (EtGly). Sono inoltre contemplati gli aminoacidi con stereoisomeria destrorsa o D-aminoacidi.

5. Proteina o peptide

Il termine "proteina o peptide" comprende sequenze aminoacidiche costituite da almeno uno dei 20 aminoacidi comuni, che si trovano nelle proteine naturali, o almeno un aminoacido modificato o inusuale.

6. Reagenti cross-leganti

I "cross-leganti" sono reagenti bifunzionali per legame incrociato che sono stati utilizzati estensivamente per vari propositi inclusi la preparazione di matrici di affinità, la modificazione e la stabilizzazione di diverse strutture, l'identificazione di siti di legame di ligandi e recettori, e studi strutturali. I reagenti omo-bifunzionali portano due gruppi funzionali identici, mentre quelli etero-bifunzionali portano

due gruppi funzionali diversi. I reagenti bifunzionali possono essere divisi secondo la specificità dei loro gruppi funzionali, cioè specifici per gruppi aminici, sulfidrilici, guanidinici, indolici, carbossilici.

7. Anticorpi

Il termine "anticorpo" si riferisce genericamente ad ogni agente capace di legame immunologico, ad esempio IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, o molecole simili ad anticorpi. Generalmente, le IgG e/o le IgM sono preferite perché sono gli anticorpi fisiologicamente più rappresentati e perché si possono facilmente produrre in laboratorio. Metodi per la preparazione degli anticorpi sono ben noti. Si definisce "anticorpo" ogni molecola simile ad anticorpo che ha una regione di legame con l'antigene, ed include frammenti anticorpali quali Fab', Fab, F(ab')₂, anticorpi a singolo dominio (DABs), Fv, anticorpi a singola catena (scFv).

8. Acidi nucleici

Un "acido nucleico" come usato qui include molecole a singolo e a doppio filamento, così come DNA, RNA, acidi nucleici chimicamente modificati e analoghi di acidi nucleici. E' contemplato dalla presente invenzione che peptidi di indirizzamento, anticorpi di indirizzamento, e proteine di fusione

possono essere codificati da qualunque sequenza nucleotidica che codifichi per l'appropriata sequenza peptidica. Il disegno e la produzione di aminoacidi codificanti per una sequenza amminoacidica desiderata è ben noto a coloro che sono esperti nella tecnica.

9. Veicoli

Vari veicoli possono essere utilizzati per la somministrazione di peptidi di indirizzamento secondo la presente invenzione; tra gli altri si possono citare i liposomi ed i sistemi di microemulsione lipidica olio-in-acqua o acqua-in olio.

I liposomi e le microemulsioni, così come altri sistemi di microveicolazione, possono essere preparati con procedure note. I ligandi sono legati covalentemente a siti discreti sulla superficie delle strutture lipidiche. Il numero e la densità di tali siti dipende dalla composizione delle microparticelle. La superficie delle medesime può avere anche siti per l'associazione non covalente di ligandi. I reagenti per legame incrociato comprendono: la glutaraldeide (GAD), l'oxirano bifunzionale (OXR), l'etilen glicole diglicidil etere (EGDE) ed una carbodiimide idrosolubile (EDC), preferibilmente.

B. PROTEINE E PEPTIDI

In una forma di attuazione, la presente invenzione concerne l'impiego diretto di un peptide capace di legarsi in modo selettivo a cellule metastatiche, preferibilmente epatiche.

A causa della taglia relativamente piccola, i peptidi di indirizzamento secondo la presente invenzione possono essere sintetizzati in soluzione o su supporto solido, seguendo tecniche convenzionali. Peptidi corti, generalmente da 6 a 35-50 aminoacidi circa, possono essere facilmente prodotti con queste tecniche. In alternativa, si può utilizzare la tecnologia del DNA ricombinante, in cui una sequenza nucleotidica che codifica per un peptide dell'invenzione è inserita in un vettore di espressione, trasformato o trasfettato in appropriata cellula ospite, coltivata in condizioni adatte per l'espressione proteica.

I peptidi secondo la presente invenzione possono essere costituiti da residui aminoacidici naturali o comprendere almeno un aminoacido modificato o inusuale.

1. Peptidomimetici

Un'altra forma di attuazione della presente invenzione prevede l'impiego di "peptidomimetici". Mimetici sono peptidi contenenti molecole che mimano

elementi della struttura secondaria delle proteine. Il razionale alla base dell'utilizzo di peptidomimetici sta nel fatto che lo scheletro peptidico delle proteine ha principalmente la funzione di orientare le catene laterali degli aminoacidi in modo da facilitare le interazioni molecolari, come quelle degli anticorpi e antigeni. Un peptidomimetico permette le interazioni molecolari allo stesso modo della molecola naturale. Questi principi possono essere sfruttati per ingegnerizzare molecole di seconda generazione, aventi molte delle proprietà naturali dei peptidi di indirizzamento descritti nella presente invenzione, ma con caratteristiche modificate e possibilmente migliorate. Un esempio di peptidomimetico è un peptide retroinverso, composto da D-aminoacidi in sequenza inversa rispetto alla sequenza peptidica che mima.

2. Proteine di fusione

I peptidi secondo la presente invenzione possono anche essere impiegati quali uno dei componenti costituenti proteine di fusione.

Le proteine di fusione comprendono l'intera sequenza od una porzione del peptide di indirizzamento legata all'N- o al C-terminale di un secondo polipeptide o proteina. Per esempio, fusioni

possono impiegare sequenze segnale di altre proteine, per permettere l'espressione di una proteina ricombinante in un ospite eterologo. Un'altra utile fusione include l'aggiunta di un dominio immunologicamente attivo, come l'epitopo di un anticorpo, per facilitare la purificazione della proteina di fusione. L'inclusione di un sito di taglio al sito di fusione o nelle immediate vicinanze faciliterà la rimozione del polipeptide estraneo dopo la purificazione. Altre fusioni utili includono il legame di domini funzionali, come siti attivi da enzimi, domini di glicosilazione, segnali di indirizzamento cellulare o regioni transmembrana.

In una forma di attuazione della presente invenzione, le proteine di fusione sono costituite da peptidi di indirizzamento fusi ad una proteina o ad un peptide con attività terapeutica. Esempi di proteine o peptidi che possono essere incorporati in una proteina di fusione includono: proteine citostatiche, proteine citotossiche, agenti pro-apoptotici, agenti anti-angiogenici, ormoni, citochine, fattori di crescita, farmaci peptidici, anticorpi, frammenti Fab di anticorpi, antigeni, proteine recettoriali, enzimi, lectine, proteine del complesso maggiore di istocompatibilità, proteine di adesione cellulare e proteine di legame. Questi

esempi non vogliono essere limitanti, ma è contemplato che, in accordo con la presente invenzione, virtualmente qualsiasi proteina o peptide possono essere incorporati in una proteina di fusione che comprende un peptide di indirizzamento. Metodi per generare proteine di fusione sono ben noti. Tali proteine possono essere prodotte, per esempio, per legame chimico utilizzando reagenti cross-leganti bifunzionali, per sintesi de novo dell'intera proteina di fusione, o mediante attacco di una sequenza di DNA codificante per il peptide di indirizzamento ad una sequenza di DNA codificante per la seconda proteina o peptide, cui segue l'espressione dell'intera proteina di fusione.

3. Anticorpi

In una diversa forma di attuazione della presente invenzione, può essere desiderabile produrre anticorpi rivolti verso i peptidi di indirizzamento oggetto della presente invenzione.

I peptidi di indirizzamento appropriati, o le molecole da essi legati, o loro porzioni, possono essere accoppiati, legati, coniugati o legati chimicamente ad uno o più agenti mediante spaziatori, poli-spaziatori, o aminoacidi derivatizzati. Questo può essere fatto in modo tale

che sia prodotta una composizione bispecifica o multivalente, oppure un vaccino. I metodi utilizzati sono familiari a coloro che sono esperti nella tecnica, e possono essere adatti alla somministrazione all'uomo, cioè farmaceuticamente accettabili. Agenti preferiti sono i trasportatori, come la emocianina (KLH) e la sieralbumina bovina (BSA). Gli anticorpi possono essere utilizzati sia per diagnostica che per terapia, ad esempio legando e/o inibendo proteine funzionali sulla superficie delle cellule metastatiche.

Per aumentare l'efficacia di molecole anticorpali, è convenzionale legarle o complessarle ad almeno un sistema o molecola, ad esempio una molecola che ne permetta la rivelazione. Esempi non limitanti di tali molecole includono enzimi, radionuclidi, aptameri, marcatori fluorescenti, molecole fosforescenti, molecole chemiluminescenti, cromofori, molecole luminescenti, particelle colorate o ligandi come la biotina.

C. CONIUGATI TERAPEUTICI E DIAGNOSTICI

In una forma di attuazione della presente invenzione, può essere desiderabile accoppiare specifici agenti bioattivi ad uno o più peptidi di indirizzamento secondo la presente invenzione per il rilascio specifico in un organo, tessuto o tipo

cellulare. Di seguito sono elencati alcuni esempi di agenti che possono essere accoppiati ai peptidi di indirizzamento secondo la presente invenzione.

I coniugati secondo la presente invenzione possono essere prodotti per coniugazione diretta dei peptidi di indirizzamento all'agente terapeutico o diagnostico di interesse o sfruttando reagenti cross-leganti per stabilire il legame tra peptide e molecola di interesse.

1. Citochine

Il termine "citochina" è un termine generico per descrivere proteine rilasciate da una popolazione cellulare, che agiscono su un'altra popolazione cellulare come mediatori intercellulari. Esempi di tali citochine includono linfocine, monochine, fattori di crescita e ormoni polipeptidici tradizionali. Inclusi fra la citochine sono ormoni della crescita come l'ormone della crescita umano, l'N-metionil ormone della crescita umano e l'ormone della crescita bovino; l'ormone paratiroideo; la tiroxina; l'insulina e la pro-insulina; la relaxina e la pro-relaxina; ormoni glicoproteici come l'ormone stimolante il follicolo (FSH), l'ormone stimolante la tiroide (TSH) e l'ormone luteinizzante (LH); il fattore di crescita epatico; le prostaglandine; il fattore di crescita

dei fibroblasti; la prolattina; il lattogeno placentare; la proteina OB; i fattori di necrosi tumorale alfa e beta; la sostanza inibente mulleriana; il peptide murino associato alla gonadotropina; l'inibina; l'attivina; la trombopietina (TPO); fattori di crescita neuronali come NGF-beta; il fattore di crescita piastrinico; fattori di crescita traformanti (TFGs) come TGF-alfa e TGF-beta; fattori di crescita simili ad insulina I e II; l'eritropoietina (EPO); fattori di crescita dell'osso; interferoni come l'interferone-alfa, beta e gamma; fattori stimolanti la colonia (CSFs) come il CSF-macrofagico (GM-CSF) e granulocitico (GM-CSF); le interleuchine (ILs) come IL-1, IL-1 alfa, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, il ligando di kit o FLT-3; l'angiostatina; la trombospondina; l'endostatina. Il termine "citochine" comprende proteine da fonti naturali o da colture di cellule ricombinanti ed equivalenti biologicamente attivi di citochine naturali.

2. Chemochine

Le "chemochine" generalmente agiscono come chemoattraenti per reclutare cellule effettrici del sistema immunitario al sito di espressione delle chemochine. Può essere vantaggioso esprimere un gene

per una particolare chemochina in combinazione, per esempio, con il gene per una citochina, per aumentare il reclutamento di altre componenti del sistema immune al sito del trattamento. Le chemochine includono, ma non sono limitate a, RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-beta e IP-10.

3. Agenti per l'analisi d'immagine

In una diversa forma di attuazione, il peptide di indirizzamento secondo la presente invenzione può essere legato ad agenti per l'analisi d'immagine e la diagnosi delle metastasi.

Molti agenti di questo tipo sono ben noti, così come i metodi per legarli a proteine o peptidi. Esempi non limitanti di ioni paramagnetici di potenziale utilità come agenti per l'analisi d'immagine includono: cromo (III), manganese (II), ferro (III), ferro (II), cobalto (II), nickel (II), rame (II), neodimio (III), samario (III), itterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), olmio (III) ed erbio (III). Ioni utili in altri contesti, quale ad esempio l'analisi mediante raggi X, includono, ma non sono limitati a, lantanio (III), oro (III) e specialmente bismuto (III).

Radioisotopi di potenziale utilizzo quali agenti diagnostici includono: ²¹¹astatina, ¹⁴carbonio,

⁵¹cromo, ³⁶cloro, ⁵⁷cobalto, ⁵⁸cobalto, ⁶⁷rame,
⁶⁷gallio, ³idrogeno, ¹²³iodio, ¹²⁵iodio, ¹³¹iodio,
¹¹¹indio, ⁵⁹ferro, ³²fosforo, ¹⁸⁶renio, ¹⁸⁸renio,
⁷⁵selenio, ³⁵zolfo, ^{99m}tecnezio e ⁹⁰ittrio.

In alcune forme di attuazione, le proteine o peptidi possono essere legati ad un secondo ligando o ad un enzima, che genererà un colore a contatto con un substrato cromogenico. Esempi di enzimi adatti alla diagnostica in vitro includono l'ureasi, la fosfatasi alcalina di rafano, la perossidasi ad idrogeno, la glucosio ossidasi. Ligandi secondari preferiti sono la biotina e composti di avidina o streptavidina. L'uso di queste molecole è ben noto.

In altre forme di attuazione, un peptide di indirizzamento secondo la presente invenzione può essere accoppiato operativamente ad una nanoparticella. Le nanoparticelle includono, ma non sono limitate a, particelle d'oro e d'argento. Le nanoparticelle metalliche sono colorate nella regione visibile dello spettro e pertanto rilevabile con analisi colorimetriche.

4. Agenti terapeutici

In una diversa forma di attuazione della presente invenzione, un peptide di indirizzamento può essere accoppiato operativamente ad agenti

terapeutici per la somministrazione selettiva, per esempio, a vasi sanguigni di tessuti metastatici.

Agenti terapeutici adatti all'uso possono includere qualunque agente chimico che induce apoptosi, morte cellulare, stasi cellulare e /o anti-angiogenesi, tra cui:

- *Regolatori della morte cellulare programmata o apoptosi.* La proteina Bcl-2 e membri della famiglia sono stati implicati nell'apoptosi, e possono essere classificati come agonisti od antagonisti dell'apoptosi. Ad esempio, Bcl-2 ed altri membri della famiglia (tra cui Bcl-XL, Bcl-W, Bcl-S, Mcl-1, A1, Bfl-1) sono pro-apoptotici, mentre altri (tra cui Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Bad, Harakiri) sono anti-apoptotici.

- *Inibitori dell'angiogenesi.* In una forma di attuazione della presente invenzione si possono somministrare peptidi di indirizzamento accoppiati ad agenti anti-angiogenici, quali angiotensina, peptidi della laminina, peptidi della fibronectina, inibitori dell'attivatore del plasminogeno, inibitori delle metalloproteinasi tissutali, interferoni, IL-12, fattore piastrinico 4, IP-10, trombospondina, 2-metossiestradiolo, proteina correlata alla proliferina, carbossiamidotriazolo, CM101, Marimastat, pentosan polisolfato,

angiopoietina 2, erbimicina A, PNU145156E, frammento 16K della prolattina, linomide, talidomide, pentossifillina, genisteina, TNP-470, endostatina, paclitaxel, accutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, o minociclina.

- *Agenti citotossici.* Agenti chemoterapici (citotossici) possono essere utilizzati per trattare varie patologie, tra cui il cancro. La maggior parte degli agenti chemioterapici cadono nelle categorie di agenti alchilanti, antimetaboliti, antibiotici antitumorali, ormoni corticosteroidi, inibitori della mitosi e nitrosouree, agenti ormonali, agenti di vario tipo, ed ogni variante o analogo dei sopra citati.

- *Agenti alchilanti.* Sono farmaci che interagiscono direttamente con il DNA genomico per bloccare la proliferazione cellulare. Un agente alchilante può includere, ma non è limitato a, un'etilenimina, una metilmelamina, un alchil sulfonato, una nitrosourea o una triazina. Essi includono, ma non sono limitati a, busulfano, clorarnbucile, cisplatino, ciclofosfamide (cytoxan), dacarbazina, ifosfamide, mecloretamine (mustargen), e melfalan.

- *Antimetaboliti.* Queste molecole distruggono la sintesi di DNA e RNA. A differenza degli agenti alchilanti, essi influenzano specificamente il ciclo

cellulare in fase S. Gli antimetaboliti possono essere differenziati in varie categorie, come gli analoghi dell'acido folico, gli analoghi delle pirimidine e delle purine e relativi composti inibitori. Gli antimetaboliti includono, ma non sono limitati a, 5-fluorouracile (5-FU), citarabina (Ara-C), fludarabina, gemcitabina e metotrexato.

- *Prodotti naturali.* Generalmente si riferiscono a composti originariamente isolati da una fonte naturale, ed identificati come aventi attività farmacologica. Tali composti, e relativi analoghi o derivati possono essere derivati da una fonte naturale, sintetizzati chimicamente o prodotti in modo ricombinante utilizzando tecniche note. I prodotti naturali comprendono categorie quali inibitori della mitosi, antibiotici antitumorali, enzimi e modificatori della risposta biologica.

- *Inibitori della mitosi.* Queste molecole includono gli alcaloidi vegetali ed altri agenti naturali che possono inibire la sintesi proteica richiesta per la divisione cellulare o mitosi. Essi operano in una fase specifica del ciclo cellulare. Gli inibitori della mitosi includono, ad esempio, docetaxel, etoposide (VP16), teniposide, paclitaxel, tassolo, vinblastina, vincristina e vinorelbina. I tassoidi sono una classe di composti correlati,

isolati dalla corteccia del frassino, *Taxus brevifolia*. Gli alcaloidi vinca sono un tipo di alcaloidi vegetali con attività farmacologica. Essi includono composti quali la vinblastina (VLB) e la vincristina.

- *Antibiotici*. È noto che alcuni antibiotici presentano attività sia antimicrobica sia citotossica. Questi farmaci interferiscono anche con il DNA inibendo chimicamente gli enzimi e la mitosi o alterando le membrane cellulari. Questi agenti non sono specifici per una particolare fase del ciclo cellulare. Esempi di antibiotici citotossici includono, ma non sono limitati a, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina (Adriamicina), plicamicina (mitramicina) e idarubicina.

- *Agenti citotossici vari*. Questi agenti, che non cadono nelle categorie precedenti, includono, ma non sono limitati a, complessi di coordinazione del platino, antracenedioni, uree sostituite, derivativi della metil idrazina, amsacrina, L-asparaginasi e tretinoina. Complessi di coordinazione del platino includono composti come carboplatino e cisplatino. Un esempio di antracenedione è il mitoxantrone. Un esempio di urea sostituita è l'idrossiurea. Un esempio di derivativo della metil idrazina è la

procarbazina (N-metil idrazina, MIH). Questi esempi non sono limitanti ed è contemplato che qualunque agente citotossico o citostatico può essere attaccato ai peptidi di indirizzamento secondo la presente invenzione e somministrato ad un organo bersaglio, ad un tessuto o ad una linea cellulare secondo gli scopi di questa invenzione.

D. ACIDI NUCLEICI

Acidi nucleici in accordo con la presente invenzione possono codificare un peptide di indirizzamento, un anticorpo di indirizzamento, un polipeptide terapeutico, una proteina di fusione o altre proteine o peptidi. L'acido nucleico può essere derivato dal DNA genomico, dal DNA complementare (cDNA), o da DNA sintetico.

In una forma di attuazione, la presente invenzione prevede l'impiego di vettori esprimenti un peptide secondo la presente invenzione per terapia genica. I vettori per terapia genica possono comprendere vari transgeni comprendenti le sequenza codificante almeno un peptide oggetto della presente invenzione codificati da DNA o RNA di un vettore di espressione.

La terapia genica può essere utilizzata per l'espressione di un gene terapeutico, ad esempio per aumentare o diminuire la neo-vascolarizzazione. Il

DNA può essere in forma di cDNA, DNA polimerizzato in vitro, DNA plasmidico, parti di DNA plasmidico, materiale genetico derivato da un virus, DNA lineare, vettori (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomi artificiali), cassette di espressione, sequenze chimeriche, DNA ricombinante, DNA cromosomico, un oligonucleotide, DNA antisenso, o derivati di questi. L'RNA può essere nella forma di RNA oligonucleotidico, tRNA (RNA transfer), snRNA (RNA nucleare piccolo), rRNA (RNA ribosomale), mRNA (RNA messaggero), RNA polimerizzato in vitro, RNA ricombinante, sequenze chimeriche, RNA anti-senso, siRNA (RNA interferente piccolo), ribozimi, o derivati di questi.

Un polinucleotide anti-senso è un polinucleotide che interferisce con la funzione del DNA e/o dell'RNA. I polinucleotidi anti-senso comprendono, ma non sono limitati a, morfolini, 2'-O-metil polinucleotidi, DNA, RNA e analoghi.

I siRNA comprendono una struttura a doppio filamento che tipicamente contiene 15-50 paia di basi ed ha una sequenza nucleotidica identica o quasi identica ad un gene bersaglio o ad un RNA espresso all'interno della cellula. L'interferenza può risultare nella soppressione dell'espressione.

Il polinucleotide può anche essere una sequenza la cui presenza o espressione in una cellula altera l'espressione o la funzione di geni cellulari o RNA. In aggiunta, DNA e RNA possono essere a singolo, doppio, triplo, o quadruplo filamento.

MATERIALI E METODI

La metodica del phage display

Il phage display è una tecnica sviluppata alla metà degli anni '80 da George Smith all'Università del Missouri^{14,15}. Il principio consiste nel selezionare peptidi a partire da una collezione, o libreria, in cui siano rappresentate virtualmente tutte le permutazioni possibili di aminoacidi. Tali peptidi vengono individuati in base alla loro capacità di legare specificamente un bersaglio di qualsiasi natura e complessità. La metodica del phage display prevede cicli di selezione ed amplificazione delle particelle leganti, allo scopo di ottenere una riduzione della diversità ed un aumento della specificità di legame.

La costruzione di una libreria fagica classica prevede l'impiego di batteriofagi filamentosi M13, in grado di infettare batteri *Escherichia coli*. Caratteristica peculiare di questi fagi è quella di possedere un genoma a singolo filamento di DNA

circolare, che può essere manipolato con le tecniche di biologia molecolare. In questo tipo di libreria, i peptidi derivano dalla trascrizione e traduzione di oligonucleotidi casuali esogeni, che sono clonati all'interno del DNA virale a monte del gene per la proteina capsidica pIII. I batteri sono trasformati con questi costrutti mediante elettroporazione; produrranno quindi una popolazione di fagi ricombinanti, ognuno dei quali conterrà un peptide diverso come fusione con la pIII. Con questo sistema è possibile creare una libreria con una diversità di circa 10^8 - 10^9 peptidi, in cui ogni sequenza è rappresentata fino a 100-1000 volte. Se la degenerazione della sequenza è completa (X_n , con X = qualsiasi aminoacido, n = numero degli aminoacidi), ognuno dei 20 aminoacidi ha la stessa probabilità teorica di essere compreso nella sequenza. Un'altra possibilità è quella di stabilire posizioni fisse per un aminoacido. Sono frequenti librerie caratterizzate da cisteine collocate in posizioni preferenziali, alle estremità del peptide o intercalate tra i residui casuali, tra le quali si formano ponti disolfuro intermolecolari che rendono il peptide circolare. La ciclizzazione dell'inserito permette una migliore esposizione della sequenza.

Abbreviazioni e soluzioni

AEC	3-Amino-9-Etil Carbazolo
Amp	Ampicillina
BSA	Siero Albumina Bovina
DMEM	Terreno Minimo di Eagles Modificato da Dulbecco
DMEM/FCS/HEPES	DMEM ad alto glucosio, FCS 2%, HEPES 20 mM
DMSO	DiMetil Solfossido
DTT	DiTio Treitololo
EDTA	Acido Etilen Diamino Tetra Acetico
FCS	Siero Fetale Bovino
GST	Glutazione-S-Transferasi
HEPES	Acido N-2-Idrossi Etil Piperazino-N'-2-Etil Solfonico
HRP	perossidasi di rafano
Kan	Kanamicina
IPTG	IsoPropil- β -D-Tio Galattoside
LB	Mezzo di coltura batterica di Luria-Bertani
PAF	paraformaldeide
PBS	Tampone Fosfato Salino, composto da NaCl 150 mM, KH_2PO_4 10 mM, pH 7,4
PEG/NaCl	Poli Etilen Glicole-8000 20%, NaCl 4 M
PMSF	Fenil Metil Sulfonil Fluoruro
SDS	Dodecil Solfato di Sodio
TAE	Tris-HCl 40 mM, Acido Acetico 0,12%, EDTA 1 mM
Tampone A	Tris HCl 50 mM a pH 7,4, NaCl 150 mM, Glicerolo 5%, DTT 2 mM
Tampone H	Tris HCl 10 mM a pH 7,4, NaCl 10 mM, PMSF 10 mM
TBS	Tampone Tris Salino, composto da NaCl 150 mM, KCl 2,8 mM e Tris Base 25 mM, pH 7,4
TBS-T	TBS-0,1% Tween-20
TB	terreno di coltura batterica Terrific Broth
Tet	Tetraciclina
TE	Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM

Reagenti

Materiale in plastica monouso: Falcon, Eppendorf.

Terreni ed altri reagenti per colture cellulari: DMEM ad alto glucosio e RPMI-1640, Sigma; DMEM e Ham's F12, Biowhittaker Europe; FCS, Gibco; Collagenasi, Roche; L-Glutamina e soluzione di Penicillina/Streptomicina, Biowhittaker Europe.

Terreni ed antibiotici per colture batteriche: LB, Sigma; TB, Gibco; Kan e Tet, Sigma.

Strataclean Beads: Stratagene.

Reagenti per immunoistochimica: DAKO Cytomation.

Campioni chirurgici

I campioni chirurgici sono derivati da pazienti operati presso l'Istituto per la Ricerca e la Cura del Cancro (I.R.C.C.) di Candiolo (TO), Divisione di Chirurgia Oncologica. Il consenso informato per la partecipazione a questo studio è stato ottenuto da tutti i donatori.

Per ogni paziente sono stati prelevati un campione di tessuto epatico sano e uno di metastasi epatica. I campioni presentavano un aspetto morfologico diverso per dimensioni, compattezza, colore, vascolarizzazione, presenza di zone necrotiche, e accumulo di aggregati adiposi (indice del grado di degenerazione provocata da steatosi). Le differenze nella natura dei tessuti sono legate

al diverso stadio della progressione della malattia, al sito di localizzazione del tumore primario, ad eventuali concause e sindromi ricorse nel processo di patogenesi, o ad altre ragioni insite nell'individualità di ciascun paziente.

I campioni sono stati processati immediatamente dopo l'espianto, al fine di disgregare il tessuto ed estrarre cellule singole su cui compiere gli esperimenti. Tutte le operazioni di manipolazione sono state eseguite sotto cappa a flusso laminare in condizioni di sterilità. I campioni sono stati sminuzzati con un bisturi in un piccolo volume di PBS. La sospensione, raccolta in PBS, è stata centrifugata per 3 minuti a 1000 rpm a temperatura ambiente ed il precipitato risospeso in 5 ml di collagenasi (0,25% peso/volume in DMEM). La digestione dei frammenti tissutali era effettuata incubando questa sospensione per 2 ore a 37°C in agitazione. Il campione è stato nuovamente centrifugato, per eliminare tutto il particolato al di sotto delle dimensioni cellulari (aggregati lipidici, porzioni di cellule) o anche cellule più piccole, di origine ematopoietica. Il precipitato è stato lavato per 2 volte in PBS. Le cellule sono state filtrate su filtri con pori dal diametro di 45 µm, contate in camera di Bürker e risospese ad una

concentrazione di 10^6 /ml in DMEM/FCS/HEPES.

All'esame microscopico, dopo la disgregazione del tessuto e la purificazione delle cellule, la popolazione cellulare primaria appariva eterogenea e si potevano distinguere, oltre agli epatociti ed alle cellule tumorali, altre tipologie cellulari. Tra queste, globuli rossi ed altre cellule di origine ematopoietica; fibroblasti derivanti dalle strutture connettivali che pervadono il tessuto parenchimatico; cellule endoteliali che delimitano i vasi sanguigni dei tessuti analizzati.

Linee cellulari

Per gli esperimenti relativi alla presente invenzione sono state utilizzate le linee tumorali umane indicate in tabella 1.

Tabella 1.

Linea cellulare	Descrizione
SW480	tumore primario al colon retto (ATCC CCL228)
SW620	metastasi al linfonodo da tumore al colon retto (ATCC CCL227)
NCI-H630	metastasi epatica da tumore al colon retto (ATCC CRL5833)
HepG2	tumore primario al fegato (ATCC HB 8065)
AGS	tumore primario allo stomaco (ATCC CRL 1739)
NCI-N87	metastasi epatica da tumore allo stomaco (ATCC CRL5822)
Capan-2	tumore primario al pancreas (ATCC HTB80)
Capan-1	metastasi epatica da tumore al pancreas (ATCC HTB79)

Linea cellulare	Descrizione
BT-474	tumore primario alla mammella (ATCC HTB 20)
MCF-7	effusione pleurica da tumore alla mammella (ATCC HTB 22)
A549	tumore primario al polmone (ATCC CCL185)
NCI-H1688	metastasi epatica da tumore al polmone (ATCC CCL257)

Terreni per colture cellulari

Per il mantenimento e l'espansione delle linee cellulari sono stati utilizzati terreni di coltura diversi, a seconda del tipo cellulare:

- le cellule SW-480, SW-620, HepG2, BT-474 e MCF-7 sono state coltivate in DMEM, addizionato di FCS al 10%, HEPES 20mM, L-glutamina (40 mM), Penicillina (200 U/ml) e Streptomicina (200 µg/ml);
- le cellule NCI-H630, NCI-N87, NCI-H1688, Capan-1 e Capan-2 sono state coltivate in RPMI-1640, addizionato di FCS al 10%, L-glutamina (40 mM), Penicillina (200 U/ml) e Streptomicina (200 µg/ml);
- le cellule A-549 e AGS sono state coltivate in Ham's F12, addizionato di FCS al 10%, L-glutamina (40 mM), Penicillina (200 U/ml) e Streptomicina (200 µg/ml).

Allestimento e mantenimento delle colture cellulari

Le colture sono state allestite a partire da cellule conservate in azoto liquido in una soluzione

composta da FCS addizionato di DMSO ad una concentrazione finale del 10%. Le cellule, dopo rapido scongelamento a 37°C, erano messe in coltura in piastre 100x20 mm, in incubatore umidificato a 37°C con atmosfera al 5% di CO₂. La completa sostituzione del terreno di coltura è stata effettuata ogni 3-4 giorni. Raggiunto l'80-90% di confluenza, le cellule erano lavate in PBS e staccate dalla piastra mediante incubazione in una soluzione costituita da tripsina 0,05% e EDTA 2 mM a 37°C per 3 minuti. Era quindi addizionato un ugual volume di terreno al 10% di FCS e le cellule erano precipitate per centrifugazione a 1000 rpm per 3 minuti. Il sopranatante era rimosso, il precipitato era risospeso in terreno completo ed aliquotato in 4 nuove piastre.

Per gli esperimenti di phage display, le cellule sono state lavate in PBS addizionato di EDTA 10 mM, ed incubate nella stessa soluzione per 3 minuti a 37°C. La sospensione cellulare è stata quindi raccolta in PBS in un volume totale di 10 ml. Dopo il conteggio in camera di Bürker, le cellule sono state risospese in DMEM/FCS/HEPES ad una concentrazione di 1×10^6 /ml.

Librerie fagiche

Per gli esperimenti di phage display sono state utilizzate due librerie cicliche del tipo CX₇C e CX₃CX₃CX₃C, e una lineare del tipo CX₉. In queste librerie l'inserto è espresso in 5 copie identiche come peptide di fusione all'N-terminale della proteina pIII. La cisteina dell'inserto, prossimale alla superficie capsidica, è legata covalentemente alla proteina del fago e, nel caso della libreria CX₇C può formare un ponte disolfuro con la cisteina all'estremità opposta. Di conseguenza, il peptide si presenta ciclizzato. Nella libreria CX₃CX₃CX₃C si possono invece formare combinazioni diverse di ponti disolfuro, che portano a ciclizzazioni multiple e all'esposizione di motivi tripeptidici.

La libreria CX₉ è lineare e non vi è ciclizzazione, se non nel caso in cui anche l'ultimo aminoacido sia una cisteina. Le librerie fagiche vengono conservate ad una temperatura di 4°C in TBS, ad una concentrazione di 10¹⁰-10¹² TU/ml.

Terreni e piastre per colture batteriche

LB: questo terreno era addizionato di Kan, ad una concentrazione finale di 20 µg/ml, per l'amplificazione dei batteri Escherichia Coli ceppo K91Kan, oppure di Kan e Tet, entrambe 20 µg/ml, per l'amplificazione dei batteri dopo l'infezione.

TB: questo terreno è stato utilizzato per rendere i K91Kan competenti all'infezione, ed era addizionato di Kan ad una concentrazione finale di 20 µg/ml.

Piastre: i batteri sono stati amplificati in piastra di Petri su un substrato semi-solido così composto: LB addizionato di agar batteriologico al 15% peso/volume e Kan (20 µg/ml) per la crescita dei K91Kan, oppure Kan (20 µg/ml) e Tet (40 µg/ml) per la crescita dei batteri dopo infezione.

Selezione delle librerie sulle cellule

Per tutte le procedure inerenti il phage display sono stati adottati i protocolli descritti in letteratura. Nello specifico, anche il protocollo di selezione su cellula intera deriva da metodiche descritte, ma è stato adattato al sistema in studio, dopo varie prove, allo scopo di ottimizzarne l'applicazione.

Primo ciclo. Un microlitro di libreria fagica era incubato con 5×10^5 cellule fresche di metastasi, in un volume totale di 500 µl in DMEM/FCS/HEPES, per 16 ore a 4°C, in lieve agitazione. Erano quindi compiuti 4 lavaggi nello stesso terreno, per eliminare i fagi legati in modo blando o rimasti in soluzione. I lavaggi erano effettuati in 1 ml del

medesimo terreno, centrifugando ogni volta il campione a 3000 rpm per 2 minuti a 4°C. Dopo l'ultimo lavaggio, il precipitato cellulare era risospeso in 100 µl dello stesso terreno.

Cicli successivi. Nei cicli successivi di selezione 50 µl di fagi derivanti dal ciclo I erano incubati con 5×10^5 cellule di fegato sano del medesimo paziente, in 500 µl di DMEM/FCS/HEPES. Questa operazione di pre-selezione negativa durava 1 ora a temperatura ambiente in lieve agitazione, ed era ripetuta per due volte. Il soprannatante era quindi diviso in due parti, che erano addizionate a 5×10^5 cellule di fegato sano o di metastasi, rispettivamente. Le due sospensioni cellulari erano incubate per 2 ore a 4°C in lieve agitazione. Seguivano i lavaggi come descritto. I fagi legati erano recuperati mediante infezione di batteri competenti.

Infezione dei batteri ed amplificazione dei fagi

I batteri erano cresciuti in 10 ml di TB addizionato di Kan, a 37°C in agitazione per 2-3 ore, fino al raggiungimento di una densità ottica di 1,5-2,0 alla lunghezza d'onda di 600 nm. Un millilitro di batteri competenti era quindi aggiunto ai 100 µl di sospensione cellulare dopo i lavaggi.

La fase di infezione durava 1 ora a temperatura ambiente. Terminata l'incubazione, parte dei batteri era piastrata, in duplicato, in piastre di Petri con LB-agar e Tet ed incubata per 16 ore a 37°C. Questo sistema permette di crescere solo batteri infettati dai fagi, dal momento che solo questi ultimi possiedono la resistenza all'antibiotico. Le TU relative ai fagi legati al substrato erano valutate mediante conta delle colonie su ciascuna piastra. Nel testo si fa riferimento a questo valore con il termine di Output.

La parte rimanente dei batteri era aggiunta a 10 ml di LB addizionato di Tet e Kan e cresciuta per 16 ore a 37°C in agitazione.

Purificazione dei fagi

Questa procedura è stata adottata per purificare sia popolazioni fagiche derivanti dai cicli di selezione sia i singoli cloni. La coltura batterica è stata centrifugata a 5000 rpm per 10 minuti a 4°C per eliminare i batteri. I fagi, rimasti nel sopranatante, sono stati precipitati con 0,15 volumi di PEG/NaCl per 1 ora a 4°C e raccolti mediante centrifugazione a 6000 rpm per 15 minuti a 4°C. Dopo aver decantato il sopranatante il precipitato è stato compattato per ulteriore

centrifugazione a 6000 rpm per 5 minuti a 4° C e successivamente risospeso, mediante agitazione per 10 minuti, in 500 µl di TBS. Per eliminare i detriti la sospensione è stata quindi centrifugata a 12000 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. La popolazione fagica è stata recuperata e conservata a 4°C.

Titolazione dei fagi

La titolazione permette di determinare la quantità di TU di partenza per ogni ciclo o il titolo dei singoli cloni (quantità cui si fa riferimento con il termine di Input). Per effettuare la titolazione, dalla sospensione fagica di partenza sono state effettuate le diluizioni riportate in tabella 2.

Tabella 2.

campione (1)	1 µl della sospensione fagica + 99 µl di PBS (diluizione 1×10^{-2})
campione (2)	10 µl del campione (1) + 90 µl di PBS (diluizione 1×10^{-3})
campione (3)	10 µl del campione (2) + 90 µl di PBS (diluizione 1×10^{-4})
campione (4)	10 µl del campione (3) + 90 µl di PBS (diluizione 1×10^{-5})
campione (5)	10 µl del campione (4) + 90 µl di PBS (diluizione 1×10^{-6})
campione (6)	20 µl del campione (5) trasferiti in nuova provetta
campione (7)	2 µl del campione (6) + 18 µl di PBS (diluizione 1×10^{-7})
campione (8)	2 µl del campione (7) + 18 µl di PBS (diluizione 1×10^{-8})

100 μ l dei campioni (6), (7) e (8), ovvero delle diluizioni 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , erano piastrati su piastre di Petri contenenti agar e Tet. Le piastre erano incubate per 16 ore a 37°C. Il numero di TU totali era quindi valutato mediante conta delle colonie e rapportato al volume totale.

Prove di legame dei singoli cloni

Queste prove sono state effettuate con un Input di 10^9 TU di ciascun clone, su cellule derivanti da metastasi epatica/linee cellulari (bersaglio) e su cellule derivanti da fegato sano (controllo negativo). L'Output di questi esperimenti è stato normalizzato rispetto al legame di un fago senza inserto, FdTet, che fornisce una misura dell'interazione non specifica dovuta al fago stesso. L'incremento di legame è stato valutato come rapporto tra Output normalizzato del bersaglio e Output normalizzato del controllo negativo. Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno 3 volte, quando possibile per disponibilità di materiale.

Isolamento ed amplificazione dei cloni

Quando si è riscontrato un incremento significativo del rapporto tra il numero di fagi legati alle cellule di metastasi rispetto a quelli legati alle cellule di fegato sano, i singoli cloni

sono stati isolati per identificare la sequenza del loro inserto e per valutarne la specificità di legame. Per l'amplificazione dei cloni, batteri da singole colonie sono stati cresciuti in 5 ml di LB addizionato di Kan e Tet per 16 ore a 37°C in agitazione. I fagi sono poi stati purificati come descritto. Da ciascun clone è stato estratto il DNA per ottenerne la sequenza.

Per disgregare meccanicamente il capsido fagico sono state utilizzate delle biglie di resina, nominate Strataclean Beads dalla ditta produttrice. Prima dell'uso le biglie erano risospese in TBS in un rapporto 1:1 volume/volume. Per ogni clone, 200 µl di sospensione fagica erano addizionati a 10 µl di biglie e sottoposti ad agitazione su vortex per 30 secondi. Dopo centrifugazione a 4000 rpm per 3 minuti, 195 µl del sopranatante erano recuperati e sottoposti ad analogo ciclo di disgregazione. Infine, 150 µl del sopranatante erano portati a 410 µl con TE, ed il DNA era precipitato mediante incubazione con 0,1 volumi di Sodio Acetato pH 5,5, glicogeno 0,2% e 2,2 volumi di Etanolo assoluto, per 2 ore a -20°C. Il DNA era recuperato centrifugando per 10 minuti a 12000 rpm, lavato in Etanolo 70%, asciugato sotto flusso d'aria sterile e risospeso in H₂O ultrapura. La quantità di DNA era valutata sia

per lettura dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 260 nm, sia per corsa su gel di Agarosio all'1% in TAE.

Preparazione dei campioni per il sequenziamento

Dieci microlitri della soluzione, corrispondenti a circa 800 ng di DNA fagico, sono stati incubati con 3 pmoli del seguente primer: 3'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-5' (SEQ ID NO. 202), che corrisponde ad una regione immediatamente a valle dell'inserito oligonucleotidico.

Analisi delle sequenze

Per tradurre le sequenze nucleotidiche in sequenze peptidiche è stato utilizzato il programma DNAsis V2.5.

Protocollo di immunohistochimica con i fagi

I campioni di tessuto erano inclusi in OCT e conservati ad una temperatura di -80°C. Al momento dell'esperimento erano tagliati utilizzando un criostato impostato ad una temperatura di -20°C.

I tessuti sono stati tagliati in fette dallo spessore di 10 μ m. Tali fette di tessuto erano poi trattate con PBS per 5 minuti, fino a completo scioglimento dell'OCT. I tessuti erano fissati con PAF al 4% in PBS, per 10 minuti a temperatura

ambiente, quindi lavati per 5 minuti in PBS ed incubati con NH_4Cl 50mM in PBS per 20 minuti.

Le perossidasi tissutali erano quindi inattivate mediante trattamento con H_2O_2 al 3% in H_2O per 10 minuti al buio a temperatura ambiente. Seguiva un lavaggio per 5 minuti in TBS.

I siti di interazione aspecifici erano bloccati incubando i preparati nel reagente "DAKO block" per 30 minuti a temperatura ambiente. Erano quindi aggiunti i fagi (da 1×10^6 fino a 5×10^6 TU) diluiti nel reagente "DAKO diluent"; l'incubazione proseguiva per tutta la notte a 4°C . Dopo 4 lavaggi di 5 minuti in TBS si effettuava la decorazione con anticorpo policlonale di coniglio anti fago M13 (Sigma B7786), diluito 1:500 nel reagente "DAKO diluent", per 1 ora a temperatura ambiente.

La rivelazione era effettuata utilizzando anticorpo secondario anti-coniglio del tipo "DAKO envision", rivelato con substrato AEC per 5 minuti. Seguiva controcolorazione dei tessuti con Ematossilina di Mayer.

Purificazione di peptidi fusi alla GST

Alcuni dei peptidi selezionati sono stati prodotti in *Escherichia coli* come proteina di fusione con GST utilizzando protocolli di

purificazione standard.

Preparazione e lisi dei batteri:

1. inoculare i batteri e crescerli per tutta la notte in 20 ml di TB/Amp a 30°C;
2. trasferire i batteri in 300 ml di terreno TB/Amp a 30°C; porre in agitazione per 1h;
3. aggiungere IPTG (concentrazione finale 1 mM) e incubare per 2h;
4. centrifugare a 5000 rpm per 15 minuti a 4°C;
5. risospendere i batteri in 10 ml di tampone A;
6. centrifugare a 3000 rpm per 20 minuti a 4°C;
7. risospendere il precipitato in 5 ml, sonicare i batteri con quattro impulsi da 20 minuti ognuno al 35% di potenza;
8. centrifugare a 11000 rpm per 20 minuti a 4°C e recuperare il supernatante.

Preparazione della resina di agarosio-glutazione:

9. idratare 250 μ l di resina in H₂O distillata, in agitazione per 1h;
10. lavare la resina 3 volte in tampone A ed infine risospenderla in ugual volume di tampone A.

Purificazione delle proteine ricombinanti:

11. aggiungere 250 μ l di resina al campione del punto 8;
12. agitare a 4°C per 1 ora;
13. lavare per 3 volte in tampone A;
14. valutare la concentrazione delle proteine per corsa elettroforetica seguita da decorazione con Blu di Coomassie.

Miscele di polimerizzazione per l'elettroforesi su gel di SDS-polialiacramide (tabella 3).

Tabella 3.

<i>Gel di corsa al 12%</i>	Acrilamide/Bis-Acrilamide (4 ml) Tris 1,5 M a pH 8,8 (3,75 ml) SDS al 10% (0,1 ml) Acqua bidistillata (2,15 ml) persolfato (100 mg/ml) (33 μ l) TEMED (8 μ l)
<i>Gel di caricamento al 5%</i>	Acrilamide/Bis-Acrilamide (0,8 ml) Tris 0,5 M a pH 6,8 (650 μ l) SDS al 10% (0,05 ml) Acqua bidistillata (3,55 ml) persolfato (100 mg/ml) (30 μ l) TEMED (5 μ l)

Colorazione con Blu di Coomassie

1. incubare il gel con Blu di Coomassie per 30-45 minuti in leggera agitazione;
2. decolorare in 45% metanolo - 10% acido acetico;
3. reidratare in acqua, eventualmente seccare su carta assorbente.

Lisi cellulare

Venti piastre 100x20 mm di cellule HepG2 (epatoma) e NCI-H630 (metastasi epatica secondaria a coloncarcinoma) sono state staccate meccanicamente in PBS e risospese in 2 volumi di tampone H, in presenza di glicerolo 10% e Nonidet-P40 0,1%. Queste sospensioni sono state incubate per 30 minuti a 4°C in agitazione poi centrifugate a 2500 rpm per 30 minuti a 4°C. La concentrazione delle proteine è stata valutata con kit BCA (Pierce), secondo le indicazioni del costruttore.

Pull-down

I peptidi-GST legati alla resina sono stati incubati per tutta la notte a 4°C con latte e lavati 7 volte in tampone A. Dieci milligrammi di lisato proteico sono stati incubati con 12 µg di GST-resina a 4°C per 1 ora per 2 volte per eliminare le proteine che legano in modo non specifico la GST o la resina. Il pull-down è stato effettuato sulle proteine non legate, con 12 µg di GST-peptide-resina, per tutta la notte a 4°C.

Dopo 4 lavaggi in Tampone A, le proteine legate al complesso GST-peptide-resina sono state eluite in 20 mM glutatione per 30 minuti a 4°C e recuperate per centrifugazione a 3000 rpm per 2 minuti a 4°C.

Il supernatante è stato caricato su gel denaturante al 10% di poliacrilamide.

Questo gel è stato successivamente colorato con una soluzione di Blu di Coomassie e le bande specifiche sono state recuperate ed analizzate mediante spettrometria di massa e microsequenza (con protocolli standard).

RISULTATI

Ricerca di motivi peptidici specifici per le metastasi epatiche umane

Per individuare peptidi capaci di legare specificamente le metastasi epatiche umane, sono state condotte selezioni di librerie fagiche su cellule in sospensione derivate da campioni di tessuto epatico sano e di metastasi, estratti dal fegato di pazienti in sede operatoria. In questa fase sono state utilizzate 11 coppie di tessuti di pazienti diversi (paziente 2, 5, 6, 7, 8, 16, 17, 18, 19, 21, 23). Nella quasi totalità, le metastasi epatiche derivavano da tumori primari del colon o del retto, con l'esclusione del paziente 8 che presentava invece come tumore primario un emangioma cerebrale (tabella 4).

Tabella 4.

Paziente	Sesso	Età	Sede ¹	TN ²	Marker ³	Virus ⁴	Necrosi ⁵
2	F	60	Colon	T3N0	CEA	No	40%
5	M	46	Colon	T4N2	CEA	No	60%
6	M	72	Colon	T3N2	CEA	No	50%
8	F	31	EP cranico			No	
7	M	64	Colon	T3N1	GICA	No	15%
16	M	45	Colon	T4N2		No	20%
17	M	70	Colon	T3N0		No	80%
18	F	62	Colon	T4N0	CEA, GICA	No	60%
19	M	76	Colon	T3N0	CEA	No	50%
21	M	59	Retto	T3N0		No	<5%
23	F	49	Colon			No	50%

1: sede tumore primitivo;

2: classificazione TN del tumore primitivo;

3: marcatori tumorali elevati;

4: presenza di virus dell'epatite B o C nel fegato;

5: percentuale di necrosi nella metastasi.

In tabella 4 sono mostrati i dati clinici dei pazienti utilizzati per la selezione. Per i pazienti 2, 6, 7 (due esperimenti), 16, 17, 18, 19 e 21 è stata utilizzata una libreria CX₇C; per il paziente 5 una libreria CX₃CX₃CX₃C; per il paziente 8, entrambe le librerie su campioni di due diverse metastasi; per il paziente 23 una libreria CX₉. Per ognuno degli esperimenti sono stati effettuati 4 cicli di selezione e amplificazione.

Analisi delle sequenze peptidiche ottenute negli esperimenti di selezione

In ciascun esperimento in cui si è osservato un

incremento significativo del rapporto di legame tra le cellule di metastasi epatica ed il controllo negativo (tessuto epatico macroscopicamente sano), 20 cloni fagici sono stati amplificati e purificati. Il DNA di ciascun clone è stato purificato e sequenziato per risalire al motivo peptidico. I peptidi selezionati sono elencati nella figura 1.

Alcune sequenze risultano particolarmente rappresentate, sia in un medesimo esperimento sia in esperimenti condotti su campioni di pazienti diversi. Negli esperimenti condotti sui pazienti 2, 5, 6, 7, 8, 21, 23 sono stati selezionati peptidi che condividono sequenze comuni, in particolare motivi di-tripeptidici (tra cui GGG, RGL, GRL, GSG, LGR, GLS, SAD, YEG, GSGS). Negli esperimenti condotti sui pazienti 16, 17, 18 si sono ricavate sequenze maggiormente ripetute. Anche in questi esperimenti ritornano motivi con elevata omologia con quelli precedentemente descritti. Il tripeptide ripetuto più costantemente è LRS.

Analisi delle sequenze selezionate

L'attenzione è stata focalizzata allo studio delle sequenze ottenute negli esperimenti 16, 17 e 18, in particolare: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1); MRYALRS (SEQ ID NO. 2); LRPGLRS (SEQ ID NO. 3); LRSGSGS (SEQ

ID NO. 4); VRSGRGS (SEQ ID NO. 5); GIYRLRS (SEQ ID NO. 6) e GVYSLRS (SEQ ID NO. 7). Per identificare omologie di sequenza tra questi peptidi e proteine note è stata effettuata una comparazione in banca dati BLAST. Da questa analisi è emerso che un numero significativo di peptidi condivide omologie di sequenza con proteine della matrice extracellulare e con molecole di adesione/motilità cellulare.

Esperimenti di legame su linee cellulari

Per valutare se gli inserti selezionati fossero ligandi specifici per determinanti di superficie espressi peculiarmente nelle metastasi epatiche, i 7 cloni sono stati testati sulle linee cellulari descritte in tabella 1. Un riassunto dei risultati è mostrato nelle tabelle 5 e 6.

In questo modello di studio, le sequenze peptidiche selezionate non legano le cellule derivate da tumore primario (tranne nel caso delle cellule BT-474). Al contrario, queste sequenze legano in modo preferenziale cellule derivate da metastasi epatiche (6 dei 7 cloni legano cellule di metastasi epatica da tumore primario al colon, 3 su 7 legano cellule di metastasi epatica da tumore primario dello stomaco o del polmone).

Tabella 5.

SEQ ID NO.	Hep-G2 Tumore al fegato	SW480 Tumore al colon	SW620 Met linfonodo da colon	NCI-H630 Met epatica da colon	AGS Tumore allo stomaco	NCI-N87 Met epatica da stomaco
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	-	+
3	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	+
5	-	-	-	+	-	+
6	-	-	-	+	-	-
7	-	+	-	-	-	-

Tabella 6.

SEQ ID No.	Capan-2 Tumore al pancreas	Capan-1 Met epatica da pancreas	BT-474 Tumore alla mamella	MCF-7 Eff pleura da mamella	A549 Tumore al polmone	NCI-H1688 Met epatica da polmone
1	-	-	-	-	-	+
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	-	-	-
6	-	-	-	+	-	+
7	-	-	-	-	+	-

Esperimenti di legame su cellule primarie

Per valutare se gli inserti selezionati fossero specifici per determinanti di superficie ubiquitari nelle metastasi epatiche umane, i 7 cloni selezionati sono stati testati su cellule primarie di metastasi epatiche, confrontando con fegato sano del medesimo paziente. Per le prove di legame sono stati utilizzati campioni di 9 pazienti (20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 31, 32), con le stesse modalità descritte per le linee cellulari. Un riassunto dei risultati è riportato in tabella 7.

Tabella 7.

SEQ ID NO.	Pz. #20	Pz. #21	Pz. #22	Pz. #25	Pz. #26	Pz. #27	Pz. #28	Pz. #31	Pz. #32
1	+				+	+	+	+	+
2	+				+	-	-	+	+
3	+	+			+	+	+	+	+
4	-		+		+	+	+	+	+
5			-		+	+	+	+	+
6				+	+	+	+	+	+

SEQ ID NO.	Pz. #20	Pz. #21	Pz. #22	Pz. #25	Pz. #26	Pz. #27	Pz. #28	Pz. #31	Pz. #32
7		+	+		+	+	+	+	+

Nei primi esperimenti, data l'esiguità delle cellule dovuta alla necessità di mettere a punto il sistema di purificazione, è stato valutato solo il legame di alcuni cloni. In generale, invece, sono state effettuate 3 prove di legame su ogni campione. Da tutti questi esperimenti emerge che il clone meno funzionale come marcatore diagnostico universale è quello che espone la sequenza MRYALRS (SEQ ID NO. 2), che in due casi (27, 28) ha dato esito negativo, mentre i cloni che hanno funzionato su tutti i pazienti sono quelli che espongono le sequenze ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), GIYRLRS (SEQ ID NO. 6) e GVYSLRS (SEQ ID NO. 7). E' interessante notare che negli esperimenti su cellule fresche gli incrementi di legame sono molto più ampi rispetto alle linee cellulari in coltura.

Esperimenti di legame su preparati tissutali

Le prove di legame dei fagi con sequenza GIYRLRS (fago #7; SEQ ID NO. 6) e GVYSLRS (fago #8; SEQ ID NO. 7) sono state effettuate su 64 campioni tissutali (tessuti tumorali e metastatici di 37 pazienti diversi): 18 campioni di metastasi epatica con rispettivo tessuto epatico sano; 4 campioni di tumore primario del colon; 2 campioni di tumore

primario del retto; 2 campioni di colon sano; 3 campioni di tumore primario della mammella; 6 tumori dell'ovaio con rispettive metastasi omentali (uno con metastasi al sigma), 2 metastasi polmonari secondarie a tumori del colon-retto e 2 metastasi polmonari secondarie a tumore renale. Risultati indicativi sono mostrati nelle figure 2-7. Il risultato di tutte le prove è riportato in tabella 8.

Tabella 8.

Tipo di tessuto	Risultato	% Campioni positivi
metastasi epatica secondaria a tumore del colon-retto	+++	75
colon sano	-	0
fegato sano	-	0
tumore primario del colon e del retto	-	0
tumore primario dell'ovaio	-+	10
metastasi omentale secondaria a tumore dell'ovaio	-+	10
metastasi al sigma secondaria a tumore dell'ovaio	-	0
metastasi polmonare secondaria a tumore del colon-retto	-	0
metastasi polmonare secondaria a tumore renale	-	0

Purificazione dei recettori

La ricerca di molecole presenti specificamente sulla superficie delle cellule metastatiche è stata effettuata mediante esperimenti di pull-down, utilizzando le linee NCI-H630 (come substrato, essendo positiva al legame di 6 fagi su 7) ed HepG2 (come controllo, essendo negativa al legame di tutti i fagi). Il pull-down è stato effettuato utilizzando il peptide GIYRLRS (SEQ ID NO. 6) prodotto come fusione con la GST. Questo esperimento è stato

ripetuto per 3 volte. In figura 9 è mostrato un gel di poliacrilamide denaturante, su cui le proteine legate al GIYRLRS-GST sono state separate e colorate con Blu di Coomassie. In figura: MM, pesi molecolari di riferimento; HepG2, lisato delle cellule HepG2; NCI-H630, lisato delle cellule NCI-H630; i numeri 250, 150, 100, 75, 50 e 37 indicano i pesi molecolari di riferimento; i numeri da 1 a 9 indicano le bande proteiche analizzate. Le proteine sono state successivamente identificate mediante spettrometria di massa.

Naturalmente, i particolari di realizzazione e le forme di attuazione potranno essere ampiamente variati rispetto a quanto descritto ed illustrato senza per questo uscire dall'ambito di protezione della presente invenzione, così come definito dalle rivendicazioni annesse.

BIBLIOGRAFIA

1. Arap, W., Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. Chemotherapy targeted to tumor vasculature. *Curr. Opin. Oncol.* **10**, 560-565 (1998).
2. Pasqualini, R., Arap, W., Rajotte, D. & Ruoslahti, E. in *Phage display: a laboratory manual* (eds. Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J.) 1-24 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2000).
3. Del Gatto, A. et al. Novel and selective alpha(v)beta3 receptor peptide antagonist: design, synthesis, and biological behavior. *J Med Chem* **49**, 3416-20 (2006).
4. Colombo, G. et al. Structure-activity relationships of linear and cyclic peptides containing the NGR tumor-homing motif. *J Biol Chem* **277**, 47891-7 (2002).
5. Corti, A. & Ponzoni, M. Tumor vascular targeting with tumor necrosis factor alpha and chemotherapeutic drugs. *Ann N Y Acad Sci* **1028**, 104-12 (2004).
6. Curnis, F. et al. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in

- tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. *Cancer Res* **62**, 867-74 (2002).
7. Di Matteo, P. et al. Immunogenic and structural properties of the Asn-Gly-Arg (NGR) tumor neovasculature-homing motif. *Mol Immunol* **43**, 1509-18 (2006).
 8. Koivunen, E., Wang, B. & Ruoslahti, E. Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library. *J Cell Biol* **124**, 373-80 (1994).
 9. Pasqualini, R. et al. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. *Cancer Res* **60**, 722-7 (2000).
 10. Pastorino, F. et al. Vascular damage and anti-angiogenic effects of tumor vessel-targeted liposomal chemotherapy. *Cancer Res* **63**, 7400-9 (2003).
 11. Burg, M. A., Pasqualini, R., Arap, W., Ruoslahti, E. & Stallcup, W. B. NG2 proteoglycan-binding peptides target tumor neovasculature. *Cancer Res.* **59**, 2869-2874 (1999).

12. Koivunen, E. et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat. Biotechnol.* **17**, 768-774 (1999).
13. Ellerby, H. M. et al. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nat. Med.* **5**, 1032-1038 (1999).
14. Scott, J. K. & Smith, G. P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-390 (1990).
15. Smith, G. P. & Scott, J. K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* **217**, 228-257 (1993).

RIVENDICAZIONI

1. Peptide capace di legarsi in modo selettivo a cellule metastatiche comprendente una sequenza amminoacidica selezionata dal gruppo costituito da: ARPGRLS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4), VRSGRGS (SEQ ID NO. 5), GIYLRLS (SEQ ID NO. 6) e GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), KYPFDKL (SEQ ID NO. 8), KVIYESWS (SEQ ID NO. 9), GLDTLLV (SEQ ID NO. 10), QSRMLRI (SEQ ID NO. 11), AAFLQGG (SEQ ID NO. 12), RSYFEML (SEQ ID NO. 13), YLHLLPP (SEQ ID NO. 14), RPTLITP (SEQ ID NO. 15), ASRVRLP (SEQ ID NO. 16), MYVVHAD (SEQ ID NO. 17), GPTLIKL (SEQ ID NO. 18), APALYHV (SEQ ID NO. 19), SVDSQMG (SEQ ID NO. 20), VVSMVGV (SEQ ID NO. 21), HLLAVSY (SEQ ID NO. 22), PGCALGS (SEQ ID NO. 23), AAGEWSG (SEQ ID NO. 24), PRLGHGS (SEQ ID NO. 25), RAGGGRL (SEQ ID NO. 26), LTVRAVD (SEQ ID NO. 27), PLGWLSY (SEQ ID NO. 28), CHRTRN (SEQ ID NO. 29), LRGGIGV (SEQ ID NO. 30), FFDGAGS (SEQ ID NO. 31), RRIDDFR (SEQ ID NO. 32), HLFLAGL (SEQ ID NO. 33), RPRTDTY (SEQ ID NO. 34), FSQGKLA (SEQ ID NO. 35), TMETGGS (SEQ ID NO. 36), GVRSVRN (SEQ ID NO. 37), HSQRFGK (SEQ ID NO. 38), VSALELS (SEQ ID NO. 39), AGMVLWT (SEQ ID NO. 40), PDGRFGG (SEQ ID NO. 41), ESPSRHT (SEQ ID NO. 42),

ARGFPGV (SEQ ID NO. 43), QSSSVIL (SEQ ID NO. 44),
RWTSSRS (SEQ ID NO. 45), AYTDFVY (SEQ ID NO. 46),
SVLENAI (SEQ ID NO. 47), LVGNFGL (SEQ ID NO. 48),
GLVGSRV (SEQ ID NO. 49), RTFSKLG (SEQ ID NO. 50),
GSIVMLS (SEQ ID NO. 51), AGGGLLR (SEQ ID NO. 52),
GVRLTA (SEQ ID NO. 53), WGAEWSS (SEQ ID NO. 54),
VREDKGI (SEQ ID NO. 55), LFILVSG (SEQ ID NO. 56),
ASWTARV (SEQ ID NO. 57), GRFMGAF (SEQ ID NO. 58),
NRTRFSS (SEQ ID NO. 59), VLGIAS (SEQ ID NO. 60),
ELAQAIS (SEQ ID NO. 61), KSVGGLQ (SEQ ID NO. 62),
TCSRLLT (SEQ ID NO. 63), FCLLCHM (SEQ ID NO. 64),
NRGRGYL (SEQ ID NO. 65), FFWSTAQ (SEQ ID NO. 66),
FLFWGRT (SEQ ID NO. 67), VMLSTGP (SEQ ID NO. 68),
GIVCLGR (SEQ ID NO. 69), GVHSRCG (SEQ ID NO. 70),
YRGFPPP (SEQ ID NO. 71), ARGMPLF (SEQ ID NO. 72),
CRDSCGR (SEQ ID NO. 73), GLLCGRD (SEQ ID NO. 74),
IRVSYGR (SEQ ID NO. 75), WRRVGD (SEQ ID NO. 76),
LGSGSWP (SEQ ID NO. 77), VFSPVNP (SEQ ID NO. 78),
SLQSVVA (SEQ ID NO. 79), IRGIGGA (SEQ ID NO. 80),
KV FARLG (SEQ ID NO. 81), VGRTVIQ (SEQ ID NO. 82),
GLPRLSG (SEQ ID NO. 83), DCVWDCM (SEQ ID NO. 84),
GLGIYVL (SEQ ID NO. 85), FFITPRS (SEQ ID NO. 86),
MGSLFG (SEQ ID NO. 87), AARYGID (SEQ ID NO. 88),
WRRSERT (SEQ ID NO. 89), KLSGVSL (SEQ ID NO. 90),
WVGGIRG (SEQ ID NO. 91), IPRSTFG (SEQ ID NO. 92),
VCWASWC (SEQ ID NO. 93), VRASPSL (SEQ ID NO. 94),

PLLYRNA (SEQ ID NO. 95), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96),
WALTTAL (SEQ ID NO. 97), IVFGRGS (SEQ ID NO. 98),
MRVFGGV (SEQ ID NO. 99), VLGSLGS (SEQ ID NO. 100),
LWSEPMV (SEQ ID NO. 101), ERAPLKA (SEQ ID NO. 012),
ISRFGYV (SEQ ID NO. 103), GLKFNWS (EQ ID NO. 104),
KSSEIPR (SEQ ID NO. 105), RRALFAT (SEQ ID NO. 106),
GWRGLRT (SEQ ID NO. 107), DYFWFAD (SEQ ID NO. 108),
SRYWTRS (SEQ ID NO. 109), RREGLRS (SEQ ID NO. 110),
SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), VSMSRSL (SEQ ID NO. 112),
LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), VYYGLRR (SEQ ID NO. 114),
LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), LLYGLEW (SEQ ID NO. 116),
VRPGLRS (SEQ ID NO. 117), IRSGFGS (SEQ ID NO. 118),
LRSGSGS (SEQ ID NO. 119), AGFGMLL (SEQ ID NO. 120),
VLGFSPW (SEQ ID NO. 121), HRRDHPE (SEQ ID NO. 122),
ARGLQRR (SEQ ID NO. 123), GVGARRS (SEQ ID NO. 124),
GMIVVGG (SEQ ID NO. 125), RRYSDAS (SEQ ID NO. 126),
SELGGGD (SEQ ID NO. 127), AGLSADI (SEQ ID NO. 128),
TSGGGIV (SEQ ID NO. 129), VLFQVQP (SEQ ID NO. 130),
DRV TGAW (SEQ ID NO. 131), VVEVAST (SEQ ID NO. 132),
AVQDPRR (SEQ ID NO. 133), GPVTIDG (SEQ ID NO. 134),
FKGPRLM (SEQ ID NO. 135), YRMIADW (SEQ ID NO. 136),
FILGVRD (SEQ ID NO. 137), QTTYGDP (SEQ ID NO. 138),
GGAVNVY (SEQ ID NO. 139), DVISDPL (SEQ ID NO. 140),
VIVGVWF (SEQ ID NO. 141), GGIWVVI (SEQ ID NO. 142),
VEAPDGT (SEQ ID NO. 143), LRFVGPR (SEQ ID NO. 144),
FDERGSF (SEQ ID NO. 145), AGGTLGV (SEQ ID NO. 146),

GTRLVLS (SEQ ID NO. 147), WGVLVRD (SEQ ID NO. 148),
KRIEDEP (SEQ ID NO. 149), RRTSIMA (SEQ ID NO. 150),
EEFQSPD (SEQ ID NO. 151), LPRAVVE (SEQ ID NO. 152),
PYEGPMPW (SEQ ID NO. 153), QGGETGYE (SEQ ID NO.
154), NQSLPSGN (SEQ ID NO. 155), GAQSTSSQ (SEQ ID
NO. 156), PSSNRWFP (SEQ ID NO. 157), ALKAYHLP (SEQ
ID NO. 158), GESAARVH (SEQ ID NO. 159), QPDNKHLF
(SEQ ID NO. 160), TALKPSFH (SEQ ID NO. 161),
YNRDTS LM (SEQ ID NO. 162), TSAPTYES (SEQ ID NO.
163), LHHRYQKQ (SEQ ID NO. 164), PYSRNTLC (SEQ ID
NO. 165), NCAKLPCV (SEQ ID NO. 166), YALTVNLG (SEQ
ID NO. 167), GLSPSGEQ (SEQ ID NO. 168), KNSEAMFT
(SEQ ID NO. 169), KWADCRRP (SEQ ID NO. 170),
WPPCGWGCRGR (SEQ ID NO. 171), SISCLWGCGSW (SEQ ID
NO. 172), GMGCLGLCGGS (SEQ ID NO. 173), GDGCPEVCVFP
(SEQ ID NO. 174), YEMCDLSCVYW (SEQ ID NO. 175),
RMPCSVSCDLM (SEQ ID NO. 176), GNSCSLHCYIW (SEQ ID
NO. 177), ARLCGGACRGL (SEQ ID NO. 178), GEECAPGCTRG
(SEQ ID NO. 179), DVDCRHLCNVH (SEQ ID NO. 180),
PQLCGGTCRGL (SEQ ID NO. 181), VAGCPVGCIRG (SEQ ID
NO. 182), LGYCSWGCARE (SEQ ID NO. 183), WPACSPECRWP
(SEQ ID NO. 184), TAGCGSMCLHV (SEQ ID NO. 185),
LFLCVFGCALV (SEQ ID NO. 186), DVQCYVRCSPD (SEQ ID
NO. 187), GGVCLGRCLGG (SEQ ID NO. 188), WRVCGALCGPA
(SEQ ID NO. 189), SGRCLGVCGWA (SEQ ID NO. 190),
AERCRMNCMKP (SEQ ID NO. 191), RKSCSGACVWG (SEQ ID

NO. 192), GAACGSGCLHV (SEQ ID NO. 193), TGACIPGCGGW (SEQ ID NO. 194), QAPCVSGCGVD (SEQ ID NO. 195), RRWCGTLCLCW (SEQ ID NO. 196), YITCGHDCVTF (SEQ ID NO. 197), RRSCGFSCVAG (SEQ ID NO. 198), LRVCNVDCMTG (SEQ ID NO. 199), SLFCQIDCVMW (SEQ ID NO. 200), WDVCLSDCVFN (SEQ ID NO. 201).

2. Peptide secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che dette cellule metastatiche sono cellule di metastasi epatiche umane.

3. Peptide secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, caratterizzato dal fatto che detto peptide è ciclico.

4. Peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, caratterizzato dal fatto che detto peptide è costituito da almeno un aminoacido modificato, un aminoacido inusuale o un aminoacido in configurazione destrogira.

5. Coniugato comprendente almeno un peptide capace di legarsi in modo selettivo a cellule metastatiche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4 ed almeno una molecola.

6. Coniugato secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detta almeno una molecola è selezionata fra un farmaco, un agente chemioterapico, un radioisotopo, un agente pro-

apoptotico, un agente anti-angiogenico, un ormone, una citochina, un agente citotossico, un agente citostatico, un antibiotico, un peptide, una proteina, un anticorpo, un frammento F_{ab} di un anticorpo.

7. Coniugato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detto agente anti-angiogenico è selezionato dal gruppo costituito da trombospondina, angiostatina, angiotensina, peptidi della laminina, peptidi della fibronectina, inibitori dell'attivatore del plasminogeno, inibitori delle metalloproteinasi tissutali, interferoni, interleuchina 12 (IL-12), fattore piastrinico 4, IP-10, 2-metossiestradiolo, proteina correlata alla proliferina, carbossiamidotriazolo, CM101, Marimastat, pentosano polisolfato, angiopoietina 2, erbimicina A, PNU145156E, frammento della prolattina 16K, Linomide, talidomide, pentossifillina, genisteina, TNP-470, endostatina, Paclitaxel, Docetaxel, poliammine, un inibitore del proteasoma, un inibitore delle cinasi, acutina, Cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470 e minociclina.

8. Coniugato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detto agente pro-apoptotico è selezionato dal gruppo costituito da

etoposide, ceramide, sfingomieline, Bax, Bid, Bik, Bad, caspasi-3, caspasi-8, caspasi-9, fas, ligando di fas, fadd, fap-1, tradd, faf, rip, apoptina, enzima che converte l'IL-2 e annexina V.

9. Coniugato secondo la rivendicazione 6, caratterizzato dal fatto che detta citochina è selezionata dal gruppo costituito da IL-1, IL-2, IL-5, IL-10, IL-11, IL-12, IL-18, interferone-gamma (IF-gamma), IF-alfa, IF-beta, TNF-alfa e GM-CSF.

10. Coniugato secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detta almeno una molecola è selezionata fra un virus, un batteriofago, un batterio, un liposoma, una microparticella, una nanoparticella, una biglia magnetica, una cellula di lievito, una cellula di mammifero.

11. Coniugato secondo la rivendicazione 10, caratterizzato dal fatto che detto virus è selezionato fra un adenovirus, un retrovirus, un virus adeno-associato.

12. Coniugato secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detta almeno una molecola è un agente diagnostico.

13. Coniugato secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che detto agente diagnostico è un agente diagnostico per scopia in

vivo.

14. Coniugato secondo la rivendicazione 13, caratterizzato dal fatto che detto agente diagnostico è selezionato fra ioni paramagnetici o radioisotopi.

15. Coniugato secondo la rivendicazione 12, caratterizzato dal fatto che detto agente diagnostico è un agente diagnostico per saggi in vitro.

16. Acido nucleico che codifica per un peptide capace di legarsi in modo selettivo a cellule metastatiche comprendente almeno una sequenza aminoacidica selezionata dal gruppo costituito da:
ARPLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2),
LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGSGS (SEQ ID NO. 4),
VRSGRGS (SEQ ID NO. 5), GIYLRLS (SEQ ID NO. 6) e
GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), KYPFDKL (SEQ ID NO. 8),
KVYESWS (SEQ ID NO. 9), GLDTLLV (SEQ ID NO. 10),
QSRMLRI (SEQ ID NO. 11), AAFLOGG (SEQ ID NO. 12),
RSYFEML (SEQ ID NO. 13), YLHLLPP (SEQ ID NO. 14),
RPTLITP (SEQ ID NO. 15), ASRVRLP (SEQ ID NO. 16),
MYVVHAD (SEQ ID NO. 17), GPTLIKL (SEQ ID NO. 18),
APALYHV (SEQ ID NO. 19), SVDSQMG (SEQ ID NO. 20),
VVSMVGV (SEQ ID NO. 21), HLLAVSY (SEQ ID NO. 22),
PGCALGS (SEQ ID NO. 23), AAGEWSG (SEQ ID NO. 24),
PRLGHGS (SEQ ID NO. 25), RAGGGRL (SEQ ID NO. 26),

LTVRAVD (SEQ ID NO. 27), PLGWLSY (SEQ ID NO. 28),
CHRTMRN (SEQ ID NO. 29), LRGGIGV (SEQ ID NO. 30),
FFDGAGS (SEQ ID NO. 31), RRIDDFR (SEQ ID NO. 32),
HLSLAGL (SEQ ID NO. 33), RPRTDTY (SEQ ID NO. 34),
FSQKLA (SEQ ID NO. 35), TMETGGS (SEQ ID NO. 36),
GVRSVRN (SEQ ID NO. 37), HSQRFK (SEQ ID NO. 38),
VSALELS (SEQ ID NO. 39), AGMVLWT (SEQ ID NO. 40),
PDGRFGG (SEQ ID NO. 41), ESPSRHT (SEQ ID NO. 42),
ARGFPGV (SEQ ID NO. 43), QSSSVIL (SEQ ID NO. 44),
RWTSSRS (SEQ ID NO. 45), AYTNFVY (SEQ ID NO. 46),
SVLENAI (SEQ ID NO. 47), LVGNFGL (SEQ ID NO. 48),
GLVGSRV (SEQ ID NO. 49), RTFSKLG (SEQ ID NO. 50),
GSIVMLS (SEQ ID NO. 51), AGGGLLR (SEQ ID NO. 52),
GVRLLTA (SEQ ID NO. 53), WGAEWSS (SEQ ID NO. 54),
VREDKGI (SEQ ID NO. 55), LFILVSG (SEQ ID NO. 56),
ASWTARV (SEQ ID NO. 57), GRFMGAF (SEQ ID NO. 58),
NRTRFSS (SEQ ID NO. 59), VLGIAVS (SEQ ID NO. 60),
ELAQAIS (SEQ ID NO. 61), KSVGGLQ (SEQ ID NO. 62),
TCSRLLT (SEQ ID NO. 63), FCLLCHM (SEQ ID NO. 64),
NRGRGYL (SEQ ID NO. 65), FFWSTAQ (SEQ ID NO. 66),
FLFWGRT (SEQ ID NO. 67), VMLSTGP (SEQ ID NO. 68),
GIVCLGR (SEQ ID NO. 69), GVHSRCG (SEQ ID NO. 70),
YRGFPPP (SEQ ID NO. 71), ARGMPLF (SEQ ID NO. 72),
CRDSCGR (SEQ ID NO. 73), GLLCGRD (SEQ ID NO. 74),
IRVSYGR (SEQ ID NO. 75), WRRVGDG (SEQ ID NO. 76),
LGSGSWP (SEQ ID NO. 77), VFSPVNP (SEQ ID NO. 78),

SLQSVVA (SEQ ID NO. 79), IRGIGGA (SEQ ID NO. 80),
KVFARLG (SEQ ID NO. 81), VGRTVIQ (SEQ ID NO. 82),
GLPRLSG (SEQ ID NO. 83), DCVWDCM (SEQ ID NO. 84),
GLGIYVL (SEQ ID NO. 85), FFITPRS (SEQ ID NO. 86),
MGGSLFG (SEQ ID NO. 87), AARYGID (SEQ ID NO. 88),
WRRSERT (SEQ ID NO. 89), KLSGVSL (SEQ ID NO. 90),
WVG GIRG (SEQ ID NO. 91), IPRSTFG (SEQ ID NO. 92),
VCWASWC (SEQ ID NO. 93), VRASPSL (SEQ ID NO. 94),
PLLYRNA (SEQ ID NO. 95), LRSGRGS (SEQ ID NO. 96),
WALTTAL (SEQ ID NO. 97), IVFGRGS (SEQ ID NO. 98),
MRVFGGV (SEQ ID NO. 99), VLGSLGS (SEQ ID NO. 100),
LWSEPMV (SEQ ID NO. 101), ERAPLKA (SEQ ID NO. 012),
ISRFGYV (SEQ ID NO. 103), GLKFNWS (EQ ID NO. 104),
KSSEIPR (SEQ ID NO. 105), RRALFAT (SEQ ID NO. 106),
GWRGLRT (SEQ ID NO. 107), DYFWFAD (SEQ ID NO. 108),
SRYWTRS (SEQ ID NO. 109), RREGLRS (SEQ ID NO. 110),
SWYTLRS (SEQ ID NO. 111), VSMSRSL (SEQ ID NO. 112),
LAYRLRS (SEQ ID NO. 113), VYYGLRR (SEQ ID NO. 114),
LTYRLRS (SEQ ID NO. 115), LLYGLEW (SEQ ID NO. 116),
VRPGLRS (SEQ ID NO. 117), IRSGFGS (SEQ ID NO. 118),
LRSGSGS (SEQ ID NO. 119), AGFGMLL (SEQ ID NO. 120),
VLGFSPW (SEQ ID NO. 121), HRRDHPE (SEQ ID NO. 122),
ARGLQRR (SEQ ID NO. 123), GVGARRS (SEQ ID NO. 124),
GMIVGG (SEQ ID NO. 125), RRYSDS (SEQ ID NO. 126),
SELGGGD (SEQ ID NO. 127), AGLSADI (SEQ ID NO. 128),
TSGGGIV (SEQ ID NO. 129), VLFQVQP (SEQ ID NO. 130),

DRVTGAW (SEQ ID NO. 131), VVEVAST (SEQ ID NO. 132),
AVQDPRR (SEQ ID NO. 133), GPVTIDG (SEQ ID NO. 134),
FKGPRLM (SEQ ID NO. 135), YRMIADW (SEQ ID NO. 136),
FILGVRD (SEQ ID NO. 137), QTTYGDP (SEQ ID NO. 138),
GGAVNVY (SEQ ID NO. 139), DVISDPL (SEQ ID NO. 140),
VIVGVWF (SEQ ID NO. 141), GGIWVVI (SEQ ID NO. 142),
VEAPDGT (SEQ ID NO. 143), LRFVGPR (SEQ ID NO. 144),
FDERGSF (SEQ ID NO. 145), AGGTLGV (SEQ ID NO. 146),
GTRLVLS (SEQ ID NO. 147), WGVLVRD (SEQ ID NO. 148),
KRIEDEP (SEQ ID NO. 149), RRTSIMA (SEQ ID NO. 150),
EEFQSPD (SEQ ID NO. 151), LPRAVVE (SEQ ID NO. 152),
PYEGPMPW (SEQ ID NO. 153), QGGETGYE (SEQ ID NO.
154), NQSLPSGN (SEQ ID NO. 155), GAQSTSSQ (SEQ ID
NO. 156), PSSNRWFP (SEQ ID NO. 157), ALKAYHLP (SEQ
ID NO. 158), GESAARVH (SEQ ID NO. 159), QPDNKHLF
(SEQ ID NO. 160), TALKPSFH (SEQ ID NO. 161),
YNRDTSLM (SEQ ID NO. 162), TSAPTYES (SEQ ID NO.
163), LHHRYQKQ (SEQ ID NO. 164), PYSRNTLC (SEQ ID
NO. 165), NCAKLPCV (SEQ ID NO. 166), YALTVNLG (SEQ
ID NO. 167), GLSPSGEQ (SEQ ID NO. 168), KNSEAMFT
(SEQ ID NO. 169), KWADCRRP (SEQ ID NO. 170),
WPPCGWGCRGR (SEQ ID NO. 171), SISCLWGCGSW (SEQ ID
NO. 172), GMGCLGLCGGS (SEQ ID NO. 173), GDGCPEVCVFP
(SEQ ID NO. 174), YEMCDLSCVYW (SEQ ID NO. 175),
RMPCSVSCDLM (SEQ ID NO. 176), GNSCSLHCYIW (SEQ ID
NO. 177), ARLCGGACRGL (SEQ ID NO. 178), GEECAPGCTRG

(SEQ ID NO. 179), DVDCRHL CNVH (SEQ ID NO. 180),
PQLCGGTCRGL (SEQ ID NO. 181), VAGCPVGCIRG (SEQ ID
NO. 182), LGYCSWGCARE (SEQ ID NO. 183), WPACSPECRWP
(SEQ ID NO. 184), TAGCGSMCLHV (SEQ ID NO. 185),
LFLCVFGCALV (SEQ ID NO. 186), DVQCYVRCSPD (SEQ ID
NO. 187), GGVCLGRCLGG (SEQ ID NO. 188), WRVCGALCGPA
(SEQ ID NO. 189), SGRCLGVCGWA (SEQ ID NO. 190),
AERCRMNCKMP (SEQ ID NO. 191), RKSCSGACVWG (SEQ ID
NO. 192), GAACGSGCLHV (SEQ ID NO. 193), TGACIPGCGGW
(SEQ ID NO. 194), QAPCVSGCGVD (SEQ ID NO. 195),
RRWCGTLCLCW (SEQ ID NO. 196), YITCGHDCVTF (SEQ ID
NO. 197), RRSCGFSCVAG (SEQ ID NO. 198), LRV CNVDCMTG
(SEQ ID NO. 199), SLFCQIDCVMW (SEQ ID NO. 200),
WDVCLSDCVFN (SEQ ID NO. 201).

17. Composizione comprendente almeno un peptide capace di legarsi in modo selettivo a cellule metastatiche secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4.

18. Composizione secondo la rivendicazione 17, caratterizzata dal fatto che detto almeno un peptide è coniugato con un farmaco.

19. Composizione secondo la rivendicazione 18, caratterizzata dal fatto che detto farmaco è un agente terapeutico capace di esercitare un effetto citotossico, citostatico, pro-apoptotico, o anti-angiogenico su dette cellule metastatiche epatiche.

20. Composizione secondo la rivendicazione 18, caratterizzata dal fatto che detto farmaco è un agente alchilante, un anti-metabolita, o un antibiotico.

21. Composizione secondo la rivendicazione 18, caratterizzata dal fatto che detto almeno un peptide è coniugato con un agente diagnostico.

22. Composizione secondo la rivendicazione 21, caratterizzata dal fatto che detto agente diagnostico è un agente diagnostico per scopia in vivo.

23. Composizione secondo la rivendicazione 21, caratterizzata dal fatto che detto agente diagnostico è un agente diagnostico per saggi in vitro.

24. Composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 17 a 23, caratterizzata dal fatto che detta composizione è formulata come una composizione farmaceutica.

25. Composizione secondo una qualsiasi rivendicazione 17 a 24, caratterizzata dal fatto che detta composizione comprende almeno un opportuno veicolo e/o eccipiente.

26. Uso di un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4 per la fabbricazione di una composizione diagnostica per la localizzazione

di cellule metastatiche in un soggetto affetto da tumore al colon-retto.

27. Uso secondo la rivendicazione 26, caratterizzato dal fatto che dette cellule metastatiche sono cellule metastatiche epatiche.

28. Uso secondo la rivendicazione 26, caratterizzato dal fatto che detta localizzazione avviene per scopia in vivo.

29. Uso secondo la rivendicazione 26, caratterizzato dal fatto che detta localizzazione avviene mediante saggi in vitro.

30. Uso di un peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4 per la fabbricazione di un medicamento per la terapia anti-tumorale in un soggetto affetto da tumore.

31. Uso di un acido nucleico secondo la rivendicazione 16 per la fabbricazione di un medicamento per la terapia anti-tumorale in un soggetto affetto da tumore.

32. Uso secondo la rivendicazione 31, caratterizzato dal fatto che detta terapia anti-tumorale consiste in una terapia genica.

33. Peptide capace di legarsi in modo selettivo a cellule metastatiche ottenibile mediante un processo comprendente: i) contattare una cellula metastatica o un tessuto contenente cellule

metastatiche con una pluralità di fagi, dove ogni fago comprende sequenze peptidiche eterologhe incorporate in una proteina fibrosa, ii) rimuovere i fagi che non legano la cellula o il tessuto e iii) isolare i fagi che legano la cellula o il tessuto.

34. Peptide secondo la rivendicazione 33, caratterizzato dal fatto che dette cellule metastatiche sono cellule metastatiche epatiche.

35. Peptide secondo la rivendicazione 34, caratterizzato dal fatto che dette cellule metastatiche epatiche derivano da un tumore primario al colon-retto.

36. Peptide secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 33 a 35, caratterizzato dal fatto che detto peptide comprende almeno una sequenza selezionata dal gruppo costituito da: ARPGLRS (SEQ ID NO. 1), MRYALRS (SEQ ID NO. 2), LRPGLRS (SEQ ID NO. 3), LRSGLRS (SEQ ID NO. 4), VRSGLRS (SEQ ID NO. 5), GIYLRLS (SEQ ID NO. 6) e GVYSLRS (SEQ ID NO. 7), KYPFDKL (SEQ ID NO. 8), KVYESWS (SEQ ID NO. 9), GLDTLLV (SEQ ID NO. 10), QSRMLRI (SEQ ID NO. 11), AAFLQGG (SEQ ID NO. 12), RSYFEML (SEQ ID NO. 13), YLHLLPP (SEQ ID NO. 14), RPTLITP (SEQ ID NO. 15), ASRVRLP (SEQ ID NO. 16), MYVVHAD (SEQ ID NO. 17), GPTLIKL (SEQ ID NO. 18), APALYHV (SEQ ID NO. 19), SVDSQMG (SEQ ID NO. 20), VVSMVGV (SEQ ID NO. 21),

HLLAVSY (SEQ ID NO. 22), PGCALGS (SEQ ID NO. 23),
AAGEWSG (SEQ ID NO. 24), PRLGHGS (SEQ ID NO. 25),
RAGGGRL (SEQ ID NO. 26), LTVRAVD (SEQ ID NO. 27),
PLGWLSY (SEQ ID NO. 28), CHRTRN (SEQ ID NO. 29),
LRGGIGV (SEQ ID NO. 30), FFDGAGS (SEQ ID NO. 31),
RRIDDFR (SEQ ID NO. 32), HLFLAGL (SEQ ID NO. 33),
RPRTDY (SEQ ID NO. 34), FSQKLA (SEQ ID NO. 35),
TMETGGS (SEQ ID NO. 36), GVRSVRN (SEQ ID NO. 37),
HSQRFK (SEQ ID NO. 38), VSALELS (SEQ ID NO. 39),
AGMVLWT (SEQ ID NO. 40), PDGRFGG (SEQ ID NO. 41),
ESPSRHT (SEQ ID NO. 42), ARGFPV (SEQ ID NO. 43),
QSSSVIL (SEQ ID NO. 44), RWTSSRS (SEQ ID NO. 45),
AYTNFVY (SEQ ID NO. 46), SVLENAI (SEQ ID NO. 47),
LVGNFGL (SEQ ID NO. 48), GLVGSRV (SEQ ID NO. 49),
RTFSKLG (SEQ ID NO. 50), GSIVMLS (SEQ ID NO. 51),
AGGGLLR (SEQ ID NO. 52), GVRLTA (SEQ ID NO. 53),
WGAEWSS (SEQ ID NO. 54), VREDKGI (SEQ ID NO. 55),
LFILVSG (SEQ ID NO. 56), ASWTARV (SEQ ID NO. 57),
GRFMGAF (SEQ ID NO. 58), NRTRFSS (SEQ ID NO. 59),
VLGIAVS (SEQ ID NO. 60), ELAQAIS (SEQ ID NO. 61),
KSVGGLQ (SEQ ID NO. 62), TCSRLLT (SEQ ID NO. 63),
FCLLCHM (SEQ ID NO. 64), NRGRGYL (SEQ ID NO. 65),
FFWSTAQ (SEQ ID NO. 66), FLFWGRT (SEQ ID NO. 67),
VMLSTGP (SEQ ID NO. 68), GIVCLGR (SEQ ID NO. 69),
GVHSRCG (SEQ ID NO. 70), YRGFPPP (SEQ ID NO. 71),
ARGMPLF (SEQ ID NO. 72), CRDSCGR (SEQ ID NO. 73),

GLLCGRD (SEQ ID NO. 74), IRVSYGR (SEQ ID NO. 75),
WRRVGDG (SEQ ID NO. 76), LGSGSWP (SEQ ID NO. 77),
VFSPVNP (SEQ ID NO. 78), SLQSVVA (SEQ ID NO. 79),
IRGIGGA (SEQ ID NO. 80), KVFARLG (SEQ ID NO. 81),
VGRTVIQ (SEQ ID NO. 82), GLPRLSG (SEQ ID NO. 83),
DCVWDCM (SEQ ID NO. 84), GLGIYVL (SEQ ID NO. 85),
FFITPRS (SEQ ID NO. 86), MGGSLFG (SEQ ID NO. 87),
AARYGID (SEQ ID NO. 88), WRRSERT (SEQ ID NO. 89),
KLSGVSL (SEQ ID NO. 90), WVG GIRG (SEQ ID NO. 91),
IPRSTFG (SEQ ID NO. 92), VCWASWC (SEQ ID NO. 93),
VRASPSL (SEQ ID NO. 94), PLLYRNA (SEQ ID NO. 95),
LRSGRGS (SEQ ID NO. 96), WALTTAL (SEQ ID NO. 97),
IVFGRGS (SEQ ID NO. 98), MRVFGGV (SEQ ID NO. 99),
VLGSLGS (SEQ ID NO. 100), LWSEPMV (SEQ ID NO. 101),
ERAPLKA (SEQ ID NO. 012), ISRFGYV (SEQ ID NO. 103),
GLKFNWS (SEQ ID NO. 104), KSSEIPR (SEQ ID NO.
105), RRALFAT (SEQ ID NO. 106), GWRGLRT (SEQ ID NO.
107), DYFWFAD (SEQ ID NO. 108), SRYWTRS (SEQ ID NO.
109), RREGLRS (SEQ ID NO. 110), SWYTLRS (SEQ ID NO.
111), VSMSRSL (SEQ ID NO. 112), LAYRLRS (SEQ ID NO.
113), VYYGLRR (SEQ ID NO. 114), LTYRLRS (SEQ ID NO.
115), LLYGLEW (SEQ ID NO. 116), VRPGLRS (SEQ ID NO.
117), IRSGFGS (SEQ ID NO. 118), LRSGSGS (SEQ ID NO.
119), AGFGMLL (SEQ ID NO. 120), VLGFSWP (SEQ ID NO.
121), HRRDHPE (SEQ ID NO. 122), ARGLQRR (SEQ ID NO.
123), GVGARRS (SEQ ID NO. 124), GMIVVGG (SEQ ID NO.

125), RRYSDS (SEQ ID NO. 126), SELGGGD (SEQ ID NO.
127), AGLSADI (SEQ ID NO. 128), TSGGGIV (SEQ ID NO.
129), VLFQVQP (SEQ ID NO. 130), DRVTGAW (SEQ ID NO.
131), VVEVAST (SEQ ID NO. 132), AVQDPRR (SEQ ID NO.
133), GPVTIDG (SEQ ID NO. 134), FKGPRLM (SEQ ID NO.
135), YRMIADW (SEQ ID NO. 136), FILGVRD (SEQ ID NO.
137), QTTYGDP (SEQ ID NO. 138), GGAVNVY (SEQ ID NO.
139), DVISDPL (SEQ ID NO. 140), VIVGVWF (SEQ ID NO.
141), GGIWVVI (SEQ ID NO. 142), VEAPDGT (SEQ ID NO.
143), LRFVGP (SEQ ID NO. 144), FDERGSF (SEQ ID NO.
145), AGGTLGV (SEQ ID NO. 146), GTRLVLS (SEQ ID NO.
147), WGVLVRD (SEQ ID NO. 148), KRIEDEP (SEQ ID NO.
149), RRTSIMA (SEQ ID NO. 150), EEFQSPD (SEQ ID NO.
151), LPRAVVE (SEQ ID NO. 152), PYEGPMPW (SEQ ID NO.
153), QGGETGYE (SEQ ID NO. 154), NQSLPSGN (SEQ ID
NO. 155), GAQSTSSQ (SEQ ID NO. 156), PSSNRWFP (SEQ
ID NO. 157), ALKAYHLP (SEQ ID NO. 158), GESAARVH
(SEQ ID NO. 159), QPDNKHLF (SEQ ID NO. 160),
TALKPSFH (SEQ ID NO. 161), YNRDTSLM (SEQ ID NO.
162), TSAPTYES (SEQ ID NO. 163), LHHRYQKQ (SEQ ID
NO. 164), PYSRNTLC (SEQ ID NO. 165), NCAKLPCV (SEQ
ID NO. 166), YALTVNLG (SEQ ID NO. 167), GLSPSGEQ
(SEQ ID NO. 168), KNSEAMFT (SEQ ID NO. 169),
KWADCRRP (SEQ ID NO. 170), WPPCGWGCRGR (SEQ ID NO.
171), SISCLWGCGSW (SEQ ID NO. 172), GMGCLGLCGGS (SEQ
ID NO. 173), GDGCPEVCVFP (SEQ ID NO. 174),

YEMCDLSCVYW (SEQ ID NO. 175), RMPCSVSCDLM (SEQ ID NO. 176), GNSCSLHCYIW (SEQ ID NO. 177), ARLCGGACRGL (SEQ ID NO. 178), GEECAPGCTRG (SEQ ID NO. 179), DVDCRHLCNVH (SEQ ID NO. 180), PQLCGGTCRGL (SEQ ID NO. 181), VAGCPVGCIRG (SEQ ID NO. 182), LGYCSWGCARE (SEQ ID NO. 183), WPACSPECRWP (SEQ ID NO. 184), TAGCGSMCLHV (SEQ ID NO. 185), LFLCVFGCALV (SEQ ID NO. 186), DVQCYVRCSPD (SEQ ID NO. 187), GGVCLGRCLGG (SEQ ID NO. 188), WRVCGALCGPA (SEQ ID NO. 189), SGRCLGVCGWA (SEQ ID NO. 190), AERCRMNCMKP (SEQ ID NO. 191), RKSCSGACVWG (SEQ ID NO. 192), GAACGSGCLHV (SEQ ID NO. 193), TGACIPGCGGW (SEQ ID NO. 194), QAPCVSGCGVD (SEQ ID NO. 195), RRWCGTLCLCW (SEQ ID NO. 196), YITCGHDCVTF (SEQ ID NO. 197), RRSCGFSCVAG (SEQ ID NO. 198), LRVCNVDCMTG (SEQ ID NO. 199), SLFCQIDCVMW (SEQ ID NO. 200), WDVCLSDCVFN (SEQ ID NO. 201).

FIGURA 1

ARPGRLS	SEQ ID NO. 1
MRYALRS	SEQ ID NO. 2
LRPGLRS	SEQ ID NO. 3
LRSGSGS	SEQ ID NO. 4
VRSGRGS	SEQ ID NO. 5
GIYRLRS	SEQ ID NO. 6
GVYSLRS	SEQ ID NO. 7
KYPFDKL	SEQ ID NO. 8
KVYESWS	SEQ ID NO. 9
GLDTLLV	SEQ ID NO. 10
QSRMLRI	SEQ ID NO. 11
AAFLOGG	SEQ ID NO. 12
RSYFEML	SEQ ID NO. 13
YLHLLPP	SEQ ID NO. 14
RPTLITP	SEQ ID NO. 15
ASRVRLP	SEQ ID NO. 16
MYVVHAD	SEQ ID NO. 17
GPTLIKL	SEQ ID NO. 18
APALYHV	SEQ ID NO. 19
SVDSQMG	SEQ ID NO. 20
VVSMVGV	SEQ ID NO. 21
HLLAVSY	SEQ ID NO. 22
PGCALGS	SEQ ID NO. 23
AAGEWSG	SEQ ID NO. 24
PRLGHGS	SEQ ID NO. 25
RAGGGRL	SEQ ID NO. 26
LTVRAVD	SEQ ID NO. 27
PLGWLSY	SEQ ID NO. 28
CHRTMRN	SEQ ID NO. 29
LRGGIGV	SEQ ID NO. 30
FFDGAGS	SEQ ID NO. 31
RRIDDFR	SEQ ID NO. 32
HLSLAGL	SEQ ID NO. 33
RPRTDTY	SEQ ID NO. 34
FSQGKLA	SEQ ID NO. 35
TMETGGS	SEQ ID NO. 36
GVRSVRN	SEQ ID NO. 37
HSQRF GK	SEQ ID NO. 38
VSALELS	SEQ ID NO. 39
AGMVLWT	SEQ ID NO. 40
PDGRF GG	SEQ ID NO. 41

Figura 1 (cont.)

ESPSRHT	SEQ ID NO. 42
ARGFPGV	SEQ ID NO. 43
QSSSVIL	SEQ ID NO. 44
RWTSSRS	SEQ ID NO. 45
AYTNFVY	SEQ ID NO. 46
SVLENAI	SEQ ID NO. 47
LVGNFGL	SEQ ID NO. 48
GLVGSRV	SEQ ID NO. 49
RTFSKLG	SEQ ID NO. 50
GSIVMLS	SEQ ID NO. 51
AGGGLLR	SEQ ID NO. 52
GVRLTA	SEQ ID NO. 53
WGAEWSS	SEQ ID NO. 54
VREDKGI	SEQ ID NO. 55
LFILVSG	SEQ ID NO. 56
ASWTARV	SEQ ID NO. 57
GRFMGAF	SEQ ID NO. 58
NRTRFSS	SEQ ID NO. 59
VLGIAVS	SEQ ID NO. 60
ELAQAIS	SEQ ID NO. 61
KSVGGLQ	SEQ ID NO. 62
TCSRLLT	SEQ ID NO. 63
FCLLCHM	SEQ ID NO. 64
NRGRGYL	SEQ ID NO. 65
FFWSTAQ	SEQ ID NO. 66
FLFWGRT	SEQ ID NO. 67
VMLSTGP	SEQ ID NO. 68
GIVCLGR	SEQ ID NO. 69
GVHSRCG	SEQ ID NO. 70
YRGFPPP	SEQ ID NO. 71
ARGMPLF	SEQ ID NO. 72
CRDSCGR	SEQ ID NO. 73
GLLCGRD	SEQ ID NO. 74
IRVSYGR	SEQ ID NO. 75
WRRVGD	SEQ ID NO. 76
LGSGSWP	SEQ ID NO. 77
VFSPVNP	SEQ ID NO. 78
SLQSVVA	SEQ ID NO. 79
IRGIGGA	SEQ ID NO. 80
KVFARLG	SEQ ID NO. 81
VGRTVIQ	SEQ ID NO. 82
GLPRLSG	SEQ ID NO. 83
DCVWDCM	SEQ ID NO. 84

Figura 1 (cont.)

GLGIYVL	SEQ ID NO. 85
FFITPRS	SEQ ID NO. 86
MGGSLFG	SEQ ID NO. 87
AARYGID	SEQ ID NO. 88
WRRSERT	SEQ ID NO. 89
KLSGVSL	SEQ ID NO. 90
WVGGIRG	SEQ ID NO. 91
IPRSTFG	SEQ ID NO. 92
VCWASWC	SEQ ID NO. 93
VRASPSL	SEQ ID NO. 94
PLLYRNA	SEQ ID NO. 95
LRSGRGS	SEQ ID NO. 96
WALTTAL	SEQ ID NO. 97
IVFGRGS	SEQ ID NO. 98
MRVFGGV	SEQ ID NO. 99
VLGSLGS	SEQ ID NO. 100
LWSEPMV	SEQ ID NO. 101
ERAPLKA	SEQ ID NO. 012
ISRFGYV	SEQ ID NO. 103
GLKFNWS	SEQ ID NO. 104
KSSEIPR	SEQ ID NO. 105
RRALFAT	SEQ ID NO. 106
GWRGLRT	SEQ ID NO. 107
DYFWFAD	SEQ ID NO. 108
SRYWTRS	SEQ ID NO. 109
RREGLRS	SEQ ID NO. 110
SWYTLRS	SEQ ID NO. 111
VSMSRSL	SEQ ID NO. 112
LAYRLRS	SEQ ID NO. 113
VYYGLRR	SEQ ID NO. 114
LTYRLRS	SEQ ID NO. 115
LLYGLEW	SEQ ID NO. 116
VRPGLRS	SEQ ID NO. 117
IRSGFGS	SEQ ID NO. 118
LRSGRGS	SEQ ID NO. 119
AGFGMLL	SEQ ID NO. 120
VLGFSPW	SEQ ID NO. 121
HRRDHPE	SEQ ID NO. 122
ARGLQRR	SEQ ID NO. 123
GVGARRS	SEQ ID NO. 124
GMIVVGG	SEQ ID NO. 125
RRYSADS	SEQ ID NO. 126

Figura 1 (cont.)

SELGGGD	SEQ ID NO. 127
AGLSADI	SEQ ID NO. 128
TSGGGIV	SEQ ID NO. 129
VLFQVQP	SEQ ID NO. 130
DRVTGAW	SEQ ID NO. 131
VVEVAST	SEQ ID NO. 132
AVQDPRR	SEQ ID NO. 133
GPVTIDG	SEQ ID NO. 134
FKGPRLM	SEQ ID NO. 135
YRMIADW	SEQ ID NO. 136
FILGVRD	SEQ ID NO. 137
QTTYGDP	SEQ ID NO. 138
GGAVNVY	SEQ ID NO. 139
DVISDPL	SEQ ID NO. 140
VIVGVWF	SEQ ID NO. 141
GGIWVVI	SEQ ID NO. 142
VEAPDGT	SEQ ID NO. 143
LRFVGPR	SEQ ID NO. 144
FDERGSF	SEQ ID NO. 145
AGTTLGV	SEQ ID NO. 146
GTRLVLS	SEQ ID NO. 147
WGVLRD	SEQ ID NO. 148
KRIEDEP	SEQ ID NO. 149
RRTSIMA	SEQ ID NO. 150
EEFQSPD	SEQ ID NO. 151
LPRAVVE	SEQ ID NO. 152
PYEGPMPW	SEQ ID NO. 153
QGGETGYE	SEQ ID NO. 154
NQSLPSGN	SEQ ID NO. 155
GAQSTSSQ	SEQ ID NO. 156
PSSNRWFP	SEQ ID NO. 157
ALKAYHLP	SEQ ID NO. 158
GESAARVH	SEQ ID NO. 159
QPDNKHLF	SEQ ID NO. 160
TALKPSFH	SEQ ID NO. 161
YNRDTS LM	SEQ ID NO. 162
TSAPTYES	SEQ ID NO. 163
LHHRYQKQ	SEQ ID NO. 164
PYSRNTLC	SEQ ID NO. 165
NCAKLPCV	SEQ ID NO. 166
YALTVNLG	SEQ ID NO. 167
GLSPSGEQ	SEQ ID NO. 168
KNSEAMFT	SEQ ID NO. 169
KWADCRRP	SEQ ID NO. 170

Figura 1 (cont.)

WPPCGWGCRGR	SEQ ID NO. 171
SISCLWGCGSW	SEQ ID NO. 172
GMGCLGLCGGS	SEQ ID NO. 173
GDGCPEVCFVP	SEQ ID NO. 174
YEMCDLSCVYW	SEQ ID NO. 175
RMPCSVSCDLM	SEQ ID NO. 176
GNSCSLHCYIW	SEQ ID NO. 177
ARLCGGACRGL	SEQ ID NO. 178
GEECAPGCTRG	SEQ ID NO. 179
DVDCRHL CNVH	SEQ ID NO. 180
PQLCGGTCRGL	SEQ ID NO. 181
VAGCPVGCIRG	SEQ ID NO. 182
LGYCSWGCARE	SEQ ID NO. 183
WPACSPECRWP	SEQ ID NO. 184
TAGCGSMCLHV	SEQ ID NO. 185
LFLCVFGCALV	SEQ ID NO. 186
DVQCYVRCSPD	SEQ ID NO. 187
GGVCLGRCLGG	SEQ ID NO. 188
WRVCGALCGPA	SEQ ID NO. 189
SGRCLGVCGWA	SEQ ID NO. 190
AERCRMNCMKP	SEQ ID NO. 191
RKSCSGACVWG	SEQ ID NO. 192
GAACGSGCLHV	SEQ ID NO. 193
TGACIPGCGGW	SEQ ID NO. 194
QAPCVSGCGVD	SEQ ID NO. 195
RRWCGTLCLCW	SEQ ID NO. 196
YITCGHDCVTF	SEQ ID NO. 197
RRSCGFSCVAG	SEQ ID NO. 198
LRVCNVDCMTG	SEQ ID NO. 199
SLFCQIDCVMW	SEQ ID NO. 200
WDVCLSDCVFN	SEQ ID NO. 201

FIGURA 2

CCCTCATAGTTAGCGTAACG

SEQ ID NO. 202

FIGURA 3

